ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 54

LE COMPLEMENT BOVIN
MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DANS LES SECRETIONS LACTEES

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Daniel MATHIEU

Né le 13 septembre 1958 à LIMOGES (Haute-Vienne)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur DUCOS
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur TAINTURIER
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur ROYAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

LEIDEN

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 54

LE COMPLEMENT BOVIN
MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DANS LES SECRETIONS LACTEES

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

par

Daniel MATHIEU

Né le 13 septembre 1958 à LIMOGES (Haute-Vienne)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur DUCOS
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
Assesseurs : ..... Monsieur TAINTURIER
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Monsieur ROYAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : ..... M.LAUTIE
Directeur honoraire : ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires : ..... M. BRIZARD
..... M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT
CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître Assistant ..... M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie Appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe -
Dermatologie - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE
DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL
ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE
Maître-Assistant ..... M. FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Radiologie - Technique Chirurgicale - Anesthésiologie
Pathologie Chirurgicale - Clinique - Traumatologie - Podologie orthopédique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle - Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître Assistant ..... M. PELLERIN
Maître Assistant ..... M. MILON

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et Economie générales - Ethologie appliquée. Sciences. Techniques. Economie de l'Elevage et des Productionsanimales
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS
Maître Assistant ..... M. ENJALBERT

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER. ARMENGAUD. COMBES. COMBRET. CROS. FERNET. et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DUCOS
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Pour avoir accepté de présider notre thèse.

Hommage respectueux

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur TAINTURIER
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour nous avoir guidé dans la rédaction de ce travail

Qu'il soit assuré de notre amitié et de nos remerciements sincères

Monsieur le Professeur ROYAL
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

PLAN

INTRODUCTION

Première partie : LE COMPLÉMENT BOVIN

I) GENERALITES

1) Définition
2) Composition
3) Activation du complément
4) Conséquence de l'activation : effets biologiques du complément

II) COMPLEMENT ET DEFENSE DE LA MAMELLE

1) Détection du complément dans les sécrétions lactées (revue bibliographique)
2) Rôles du complément : hypothèses

Deuxième partie : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DU COMPLÉMENT DANS LES SÉCRÉTIONS LACTÉES

TECHNIQUE

I) DEFINITION DU SYSTEME HEMOLYTIQUE

1) Les globules rouges
2) Les hémolysines
3) Le facteur temps

UNIV. LYON 1

II) CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE TURBIDIMETRIQUE

1) Sensibilité - Limite inférieure de détection
2) Répétabilité

III) TRAITEMENT DES ECHANTILLONS : Etude succinte du pouvoir anticomplémentaire (P.A.C.) - Conséquence sur le choix d'une technique radio-immunologique

IV) EXPRESSION DES RESULTATS

V) CRITIQUE DE LA METHODE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I) REACTIFS

1) Globules rouges
2) Hémolysines - sensibilisation des globules rouges
3) Le complément
4) Les échantillons

II) TECHNIQUE

1) Réaction d'hémolyse quantitative
2) Mesure du degré d'hémolyse
a) méthode turbidimétrique
b) méthode radio-immunologique

Troisième partie : RÉSULTATS

I) RELATION BACTERICIDIE - QUANTITE DE COMPLEMENT

II) DOSAGE DU COMPLEMENT DANS DES ECHANTILLONS DE FIN DE LACTATION

1) Relation quantité de complément - niveau cellulaire
2) Relation quantité de complément - sérumalbumine
3) Relation quantité de complément - statut infectieux

CONCLUSION

ANNEXES : N° 1 : Programme du compteur à radioactivité
2 : Programme informatique de calcul des quantités de complément
3 : Mesure des titres en complément et en PAC d'échantillons de fin de lactation en fonction du statut infectieux et du pouvoir bactéricide
4 : Dosage du complément dans des échantillons de fin de lactation en fonction du statut infectieux, du niveau cellulaire et de la sérumalbumine.

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

La France est le premier producteur de lait du Marché Commun, et cette place s'accompagne d'efforts constants dans les domaines de la génétique, de la nutrition, de la planification de la reproduction, et ce, afin d'améliorer la productivité. En fait, les progrès concernant l'hygiène de la traite et la qualité du lait sont moins importants que ne le laisse prévoir cette première place : ainsi 15 % des laits de tanks ont plus de 1 million de cellules/ml, tandis que 50 % ont plus de 500 000 cellules par ml (43).

Ceci n'est pas étonnant car si l'éleveur se préoccupe des mammites cliniques, les mammites sub.cliniques qui atteignent pourtant près de 50% du cheptel laitier (5) sont ignorées car non visibles. Elles représentent pourtant 80 % des deux milliards de francs que coûtent les mammites chaque année (35) répartis en baisse de production, baisse de qualité technologique, frais de traitement, réforme des animaux incurables (représentant 15% des réformes totales).

Un plan de prophylaxie des mammites sub.cliniques a été mis au point par les Anglais (12). Il repose essentiellement sur l'utilisation d'une installation de traite en bon état de fonctionnement,le trempage des trayons, le traitement au tarissement, le traitement adéquat des mammites aiguës, l'élimination des animaux réagissant mal au traitement. Cette prophylaxie médico-sanitaire, si elle montre une efficacité notable (12), a certaines limites conceptuelles et matérielles:

D'une part, elle ne peut empêcher la présence des germes pathogènes dans le milieu extérieur ainsi que la grande susceptibilité aux infections de la mamelle traumatisée par la traite. D'autre part, ce plan fait appel à la bonne volonté et à la compétence de l'éleveur qui n'est pas toujours sensibilisé à ce problème.

Pour l'avenir, une véritable et efficace prévention ne peut que passer par l'induction ou la stimulation des défenses immunitaires de la mamelle. Jusqu'ici, toutes les tentatives de vaccination ont échoué (31,57) du fait de la grande variabilité des espèces et/ ou souches bactériennes, et donc des motifs antigéniques et de l'incapacité actuelle d'obtenir dans la mamelle une immunité humorale persistante et efficace. L'établissement d'une barrière cellulaire reconnue comme efficace (18, 33, 47) est peu compatible avec la qualité technologique et le souci des consommateurs. Aussi, afin de parvenir à cette autodéfense immunologique de la mamelle (prophylaxie médicale des mammites) il apparaît indispensable d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires locaux spécifiques ou non spécifiques.

C'est dans ce sens que nous avons entrepris l'étude du Complément bovin dont nous verrons qu'il est l'un des composants majeurs de la réaction immunitaire.

Aussi, dans un premier temps, étudierons-nous tout d'abord le Complément Bovin, ses particularités, son importance. Nous exposerons par la suite nos recherches sur la mise au point d'une technique de dosage du Complément bovin dans les secrétions lactées.

Première Partie

Le Complément Bovin

I) GENERALITES

1) Définition

On désigne par C (complément) un ensemble de globulines circulant à l'état inactif dans tout sérum animal normal et pouvant être activé dans un ordre bien déterminé et constant sous l'influence de différents facteurs le plus souvent de nature immunologique.

Le nombre de ses composants n'est pas encore arrêté.

Son activation entraîne l'apparition de phénomènes biologiques divers et très importants dans l'étude des mécanismes immunologiques et/ ou physiopathologiques.

2) Composition

On décrit de façon habituelle 9 fractions numérotées C_1 à C_9 qui sont celles intervenant dans la voie classique. L'historique de leur découverte est illustré par le schéma de STAUB et ETIEVANT (fig. n°1).

Cependant chez l'homme on intègre aujourd'hui au système Complément :

- les composants de la voie alterne
- les inhibiteurs

qui, sauf exception, sont désignés par le composant qu'ils inhibent suivi des lettres INH :

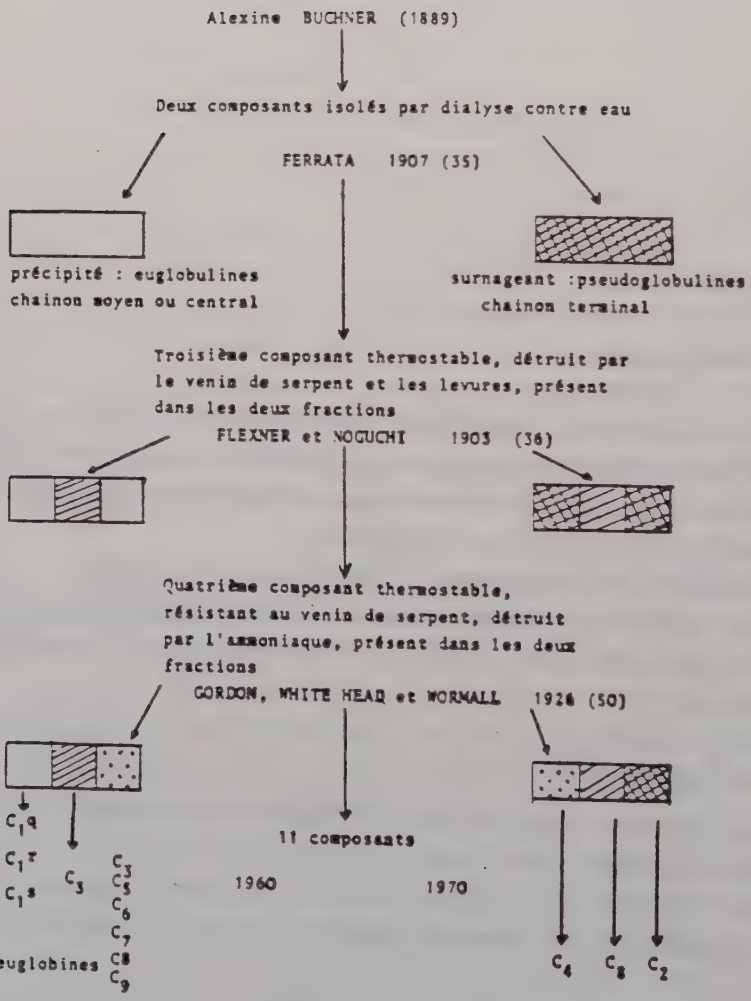


FIGURE 1
Mise en évidence des fractions du complément d'après STAUB et ETIEVANT(59)

C_1 INH
C_3b INH ou KAF (konglutinin activating factor)
C_6 INH
C_3a INH, C_5a (inh. des ana phylatoxines)

Chez les bovins, les connaissances biochimiques sont moins avancées, mais tout porte à croire qu'un système identique existe. En 1980, TRIGLIA et LINSCOTT ont réussi à doser et parfois isoler 9 composants, un inhibiteur du C_3b, (54) et une protéine (BSP) à activité " facteur B"(32)c'est-à dire intervenant dans la voie alterne. Les tableaux 1 et 2 montrent qu'il existe une très grande similitude entre les fractions humaines et bovines. D'autre part le dosage de ces fractions montre des titres élevés, souvent supérieurs à 10^5, ce qui est hautement différent des résultats trouvés antérieurement (2) et ce qui rapproche ces titres de ceux trouvés chez l'homme (1).

La comparaison des dosages entre sérums frais et sérums chauffés démontre la thermolabilité des fractions C_1, C_2, C_8 et C_7 à un moindre degré. L'augmentation des taux apparents de C_3 et C_6 est due à l'inactivation d'inhibiteurs thermosensibles de ces fractions.

Chez les bovins, l'ontogénie du complément est peu connue de même que la localisation exacte de la synthèse des différentes fractions. Néanmoins, le tableau 3 montre que le sérum foetal contient, par rapport à l'adulte :

1 à 3 % des taux de C_1, C_6
5 à 50 % des autres composants hormis le C_3,non détectable, mais présent à la naissance.

Il est à noter que la thermolabilité de C_7 et C_8 est moins importante chez le foetus que chez l'adulte, sans que ce phénomène ait reçu d'explication satisfaisante.

TABLEAU N°1 = Comparaison de propriétés biochimiques de fractions des Compléments bovins et humains (1, 4, 5, 7, 8)

N°fraction	C_1			C_1q	C_4				C_4a
	PM (°)	Subdivision en 2 chaînes de PM		(PM)	PM	Subdivision en 3 chaînes α	β	γ	(PM)
Bovin	88 000	6 500	27 000	430 000	200 000	98 000	82 000	32 000	9 500
Homme	85 000	55 000	27 000	400 000	240 000	93 000	78 000	33 000	8 000-16 000

(°) = PM = poids moléculaire

TABLEAU N°2 = Thermolabilité (°) des différentes fonctions des Compléments bovins et humains (1,60)

	C_1	C_4	C_2	C_3	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9
Bovin	+	0	+	↗	0	↗	±	+	0
Homme	+	0	+	0	+	0	0	+	+

(°)après chauffage : 1 heure à 56°C (+) thermolabile (0) thermostable ↗ : augmentation des taux apparents

TABLEAU N°3 = Activité lytique des différentes fractions du Complément bovin et humain (d'après Triglia (60) modifié).

	C_1	C_4	C_3	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	
Sérum de bovin adulte	5000	0	50	50	2400	270	3200	2400	BARTA.1976
	500000	31000	1700	280000	12000	400000	6400	220000	TRIGLIA
Sérum de bovin adulte chauffé	< 100	20000	18000	200000	31000	80000	40	140000	1980
Sérum de foetus bovin	8400	≤ 10	< 10	9000	460	220000	1000	30000	
Sérum de foetus bovin chauffé		< 10	< 10	8000	2900	84000	140	23000	
Sérum humain	150000	150000	3000.6000	600à 2400	3000à 12000	5000 à 6000	6000	50000	BACH 1976

3) Activation du complément

Les composants du complément , inactifs dans le sérum normal, peuvent être activés par 2 voies (fig. n°2)

a) Voie classique

Elle est appelée à tort " spécifique ", en effet, si souvent elle est déclenchée par les complexes Ag-Ac, elle peut l'être également par des Ig dénaturées, des cellules traitées par des toxines. Notons que seules certaines Ig peuvent fixer le complément par leur fragment Fc : Ig G_1, G_2, Ig M.

Le C_1, qui comporte 3 sous unités C_1q, C_1r, C_1s reliées par des ions Ca^{2+} et peut se fixer sur l'Ac, est alors activé et provoque à son tour la formation de la C_3convertase

$$(C \xrightarrow[4b\ 2a]{})$$

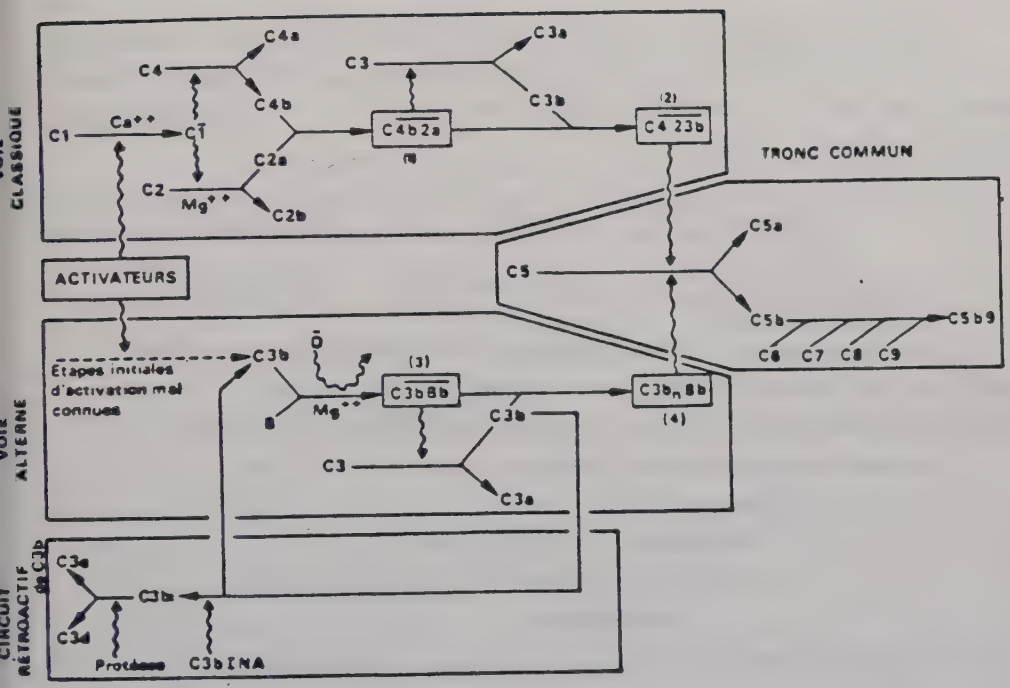
enzyme capable de cliver le C_3, qui entraîne l'action de C_3 à C_9.

b) Voie alterne

Elle peut être déclenchée par des substances immunocompétentes (complexe Ag-Ac), ou bien par des substances non immunologiques (zymosan, lyopolysaccharides bactériens, une substance extraite du venin de cobra.. (15)).

Elle met en jeu des protéines étrangères à la voie classique :

/ Properdine ou facteur P
/ C_3 PA ou facteur B
/ Convertase du C_3 PA ou facteur D
/ Initiating Factor ou IF



— Schéma d'ensemble du système complémentaire, avec les voies classique et alterne d'activation, le tronc commun et le circuit rétroactif de C_3b (boucle d'amplification ou C_3-feed back). (1) C_3 convertase de la voie classique, (2) C_5 convertase de la voie classique, (3) C_3 convertase de la voie alterne, (4) C_5 convertase de la voie alterne. Les flèches « sinusoïdales » indiquent les activités enzymatiques ou les réactions directement dépendantes des activateurs.

Fig. n°2 - Voies d'activation du complément
(d'après Bach. 1976)

Le déroulement intime de cette voie est très complexe (fig.n°2) Il comprend une phase d'activation initiale et une boucle d'amplification où la properdine joue un rôle stabilisateur et protecteur important.

De nombreux mécanismes homéostatiques interviennent pour contrôler l'activation du complément. Ce sont essentiellement l'instabilité des composants activés, les inhibiteurs spécifiques sus-cités, la conglutinine vraie chez les bovins (15,28).

4°) *Conséquences de l'activation : effets biologiques du complément*

a) Effet de lyse

Ce fut le premier effet biologique du complément découvert par PFEIFFER sur les vibrions cholériques. L'effet de lyse résulte de l'interaction du complément activé et des membranes biologiques cellulaires.

Suivant la cellule-cible on distingue :

- l'hémolyse,
- la bactériolyse et la virolyse
- la cytolyse (c'est-à-dire la lyse de cellules eucaryotes).

La lésion en cratère résulte de l'activation de la chaîne terminale (C_3 à C_9)

&) Hémolyse

L'hémolyse immunologique est aujourd'hui le support de très nombreux tests biologiques : dosage ou "déviation du complément" par photométrie, turbidimétrie, technique des plages de lyses de Jerne.

Le complément de bovin a été longtemps classé parmi les compléments non hémolytiques, au côté du cheval et du lapin (52). En fait, BARTA (2) a montré que l'activité hémolytique du complément bovin est extrêmement variable suivant le système choisi, et la nature des tampons utilisés. Le tableau 4 montre que les titres hémolytiques ne sont pas négligeables, surtout en utilisant les globules rouges de cobayes qui s'avèrent les plus sensibles.

Les facteurs influençant le titre hémolytique d'animaux en bonne santé sont : l'âge (40), la race (19), mais surtout, un facteur individuel qui semble très important (60).

TABLEAU N°4 : Titres hémolytiques (CH_{50}/ml) du complément sérique bovin

195,8	± 24	(40)	Hématies de
156		(41)	lapin
10	⟶ 150	(42)	
10	⟶ 30	(50)	
0	⟶ 250	(19)	
0	⟶ 10	(41)	Hématies de
60		(61)	mouton
24	⟶ 256	(2)	
60	⟶ 500	(3)	Hématies de cobaye

&) Bactériolyse, virolyse, cytolyse

Bien que résultant d'une action identique du complément activé, les lésions induites au niveau de la cellule-cible semblent être différentes.

WRIGHT et LEVINE (59) montrent que si une seule lésion est suffisante pour attaquer la membrane cytoplasmique érythrocytaire et entraîner la lyse de l'hématie par des phénomènes d'osmose, deux lésions au moins sont nécessaires pour détruire E.coli.En outre, le complément semble se fixer entre les membranes externes et internes de la paroi, y créant des lésions par action enzymatique, et seule l'activation des enzymes lysosomiales qui agissent sur le mucopeptide de la paroi entraîne l'éclatement de la bactérie.

Pour les virus, les phospholipides de la paroi seraient le lieu d'élection .

La membrane cytoplasmique est pour les cellules eucaryotes le siège des lésions. La cytolyse est engendrée par l'activation des enzymes lysosomiales. La cytolyse immunologique est à la base de nombreuses réactions in vivo (rejets d'organes, immunoallergies iatrogènes contre des haptènes se fixant sur des cellules) ou in vitro (tests de cytotoxicité).

b) Autres effets biologiques

Le phénomène de lyse est loin d'être la seule action du complément. En particulier, in vivo, la bactériolyse ne peut, en aucun cas, justifier à elle seule l'importance du complément dans les mécanismes de défense de l'organisme. En effet, le complément agit également sur : (1)

. La phagocytose

par des facteurs chimiotactiques $C_{\overline{567}}$, C_3a, C_5a

en facilitant l'opsonisation (récepteur pour le C_3b)

en facilitant l'immunoadhérence : formation de complexe Ag-Ac - C_3b ou C_4a - cellule (plaquette, hématie ..) qui est, lui-même, phagocyté dans son ensemble.

. L'inflammation

par des facteurs chimiotactiques sus cités

par des anaphylatoxines libérées au cours de l'activation (C_3a, C_5a)

par un fragment à activité kinine = C_2a

. Conglutination, précipitation

. Coagulation

Le complément activé peut intervenir dans la coagulation, mais inversement, il peut y avoir clivage des fractions C_1s, C_3, C_3b par la plasmine ou la thrombine

. Bactéricidie intracellulaire (22, 23)

propriété [mise en évidence pour les granulocytes et polynucléaires neutrophiles] qui s'avère indispensable pour le bon fonctionnement des cellules à activité phagique.

. Le déclenchement de la réaction immunitaire (34).

Ces nombreuses propriétés biologiques concernant tant l'inflammation que l'immunité cellulaire ou humorale, spécifique ou non spécifique, laissent penser que le complément doit jouer un rôle important dans la défense de la mamelle vis-à-vis des infections bactériennes.

II) COMPLEMENT ET DEFENSE DE LA MAMELLE

1) *Détection du complément dans les sécrétions lactées.*

(revue bibliographique)

Plusieurs tests ont été utilisés pour rechercher le complément.

. La conglutination (21) utilise les premières fractions du complément ($C_{1,4,2,3}$). Cette épreuve s'est révélée positive dans les sécrétions de fin de

lactation, sécrétions de vaches taries, colostrales,pré et post-colostrales jusqu'à quelques semaines après le vêlage.

Le complément a été retrouvé souvent dans le lait de mélange, mais pas dans tous les échantillons individuels par REITER (37), mais plus récemment De CUENINCK (10) trouve du complément dans des échantillons de milieu de la lactation

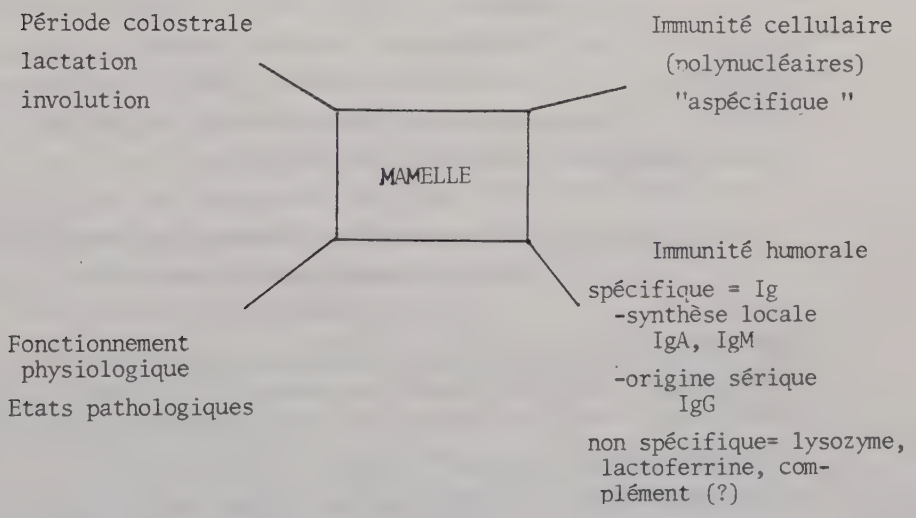
. L'hémolyse et la bactéricidie mettent en évidence tous les composants du complément. L'activité hémolytique n'a été démontrée que dans le colostrum (6,13), donnant des titres de 5 $\pm$ 3,4 UH_{50}. L'activité bactéricide a été retrouvée dans le colostrum (6) et dans les réactions post-colostrales (38), mais semble très variable dans le lait. La bactéricidie a été retrouvée dans des échantillons de fin de lactation (36).

En somme, hormis les cas très particuliers des sécrétions de vaches taries, ou péricolostrales, le complément n'a pas été mis en évidence de façon directe.

2) *Rôles du complément* : hypothèses

Malgré l'échec de toute tentative de mise en évidence d'une activité totale du complément dans les sécrétions lactées, de nombreux auteurs pensent que le complément doit être présent (13, 36, 38, 58). Il est, en effet, utile, voire indispensable à de nombreuses réactions immunitaires au sein de la mamelle. Le schéma 3 montre les différents aspects de l'immunité mammaire, liés aux différents états physiologiques et pathologiques.

Schéma n°3 : Support de l'immunité mammaire
(d'après Watson (58), modifié)



Le complément inter agit avec les cellules immunocompétentes. Dans la mamelle, les leucocytes, qui représentent 80 à 85% des cellules somatiques (49) constituent une barrière efficace contre les infections (18,47) bien que ces cellules aient une activité phagocytaire et bactéricide faible (20,29,46) et que leur présence à un taux suffisant (500000 cellules/ml) n'ait lieu que trop tard (24 h) après la colonisation de la mamelle (30,48) par les micro-organismes.

La leucocytose que l'on pensait être une réponse inflammatoire aspécifique peut, en fait, faire suite à une reconnaissance antigénique spécifique (11). D'autre part, LEIJH et LEIST.WELSH (22, 23) ont montré que le complément intervient dans la phagocytose et la bactéricidie intracellulaires de bacilles gram négatifs.

Le complément interagit avec les immunoglobulines qui sont capables de fixer la fraction C_1q sur leur fragment Fc (Ig, G_1, G_2M) cette liaison pouvant être le départ de la bactériolyse immune. Cependant, il faut reconnaître, comme le montre le tableau n°5, que le taux d'immunoglobulines dans le lait est faible.

TABLEAU N°5 =Concentration d'immunoglobulines dans le sérum , lactosérum, colostrum bovins (d'après Mackensie et Lascelles (26)

mg/ml	Ig G_1	Ig G_2	Ig A	Ig M
sérum	14	13	0,39	3,8
colostrum	40-80	2,5	4,5	6
lactosérum	0,4	0,06	0,1	0,09

A fortiori, le taux d'immnuglobulines à activité anticorps et pouvant fixer le complément est encore plus faible. La stimulation antigénique locale ne permet d'accroître que le taux d'Ig A (24,25) ne fixant pas le complément, alors que le transfert relatif d'Ig G_1 est fortement diminué par tout processus inflammatoire (26). L'intérêt du complément dans l'immunité humorale spécifique de la mamelle n'est donc pas encore bien mis en évidence.

Rappelons, cependant, que l'activation du complément par des endotoxines bactériennes peut être à l'origine de la réaction immunitaire (34).

La défense humorale non spécifique est assurée par plusieurs systèmes complexes, dont le complément, et qui peuvent parfois agir en synergie. Ce sont : le *système enzymatique lactopéroxydase/thiocyanate/peroxyde* efficace sur de nombreux germes (39), la *lactoferrine*, protéine captant le fer indispensable à la croissance bactérienne et dont la concentration augmente beaucoup pendant la phase inflammatoire (16) et la période d'involution (51), le *lysozyme* en faible quantité par rapport au lait humain (50.) et dont le rôle bactéricide bien que discuté serait accru par la présence d'immunoglobulines et de complément (17) et *certaines protéines bactéricides secrétées par les polynucléaires* et dont le complément serait susceptible d'augmenter la formation (14).

La présence des différentes fractions du complément dans les sécrétions lactées, bien que rarement prouvée est donc supposée pour de nombreuses raisons biologiques.

Aussi peut-on penser que si l'activité hémolytique du complément n'a pas été retrouvée, cela peut être la conséquence soit de l'emploi de techniques insuffisamment sensibles, soit de la présence dans ces mêmes secrétions d'une substance (pouvoir anti complémentaire ?) empêchant " l'alexine de se fixer sur les globules sensibilisés" (BORDET. 1908), soit d'un défaut de préparation des échantillons pouvant subir une décomplémentation involontaire (préparation du lactosérum à l'aide de présure à 37°C). La technique recherchée doit tenir compte de ces trois paramètres.

Deuxième Partie

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DU COMPLÉMENT DANS LES SÉCRÉTIONS LACTÉES

TECHNIQUE

Pour répondre au triple objectif :

1) mettre au point une technique sensible, répétitive,
2) doser l'activité hémolytique éventuelle des sécrétions lactées,
3) estimer le pouvoir anticomplémentaire,

nous avons utilisé un système hémolytique classique (globules rouges + sérum anti), mais en étudiant, tout particulièrement, les conditions, compte tenu des particularités hémolytiques du complément bovin et du faible taux probable de complément dans le lait et ses dérivés.

I) *DEFINITION DU SYSTEME HEMOLYTIQUE*

1) Les globules rouges

Toute réaction d'hémolyse avec utilisation du complément (C) implique le choix de la cellule-cible. Ceci est encore plus vrai pour le complément bovin dont l'activité hémolytique varie considérablement suivant l'espèce fournissant les globules rouges d'une part, et les conditions d'utilisation d'autre part (2).

BARTA recommande l'utilisation des globules rouges de cobaye qui s'avèrent les plus sensibles à l'action hémolytique du complément bovin.

En outre, pour des concentrations d'hématies sensibilisées supérieures à 10^5/ ml,le nombre d'hématies lysées en présence d'excès

d'hémolysines est fonction de la quantité de complément. La réaction est donc d'autant plus sensible que l'on met en jeu une faible quantité de complément donc un minimum d'hématies sensibilisées (52).

Nous avons choisi une concentration finale de globules rouges de 3,5 10^7 GR/ml, ce qui est peu différent de celle recommandée par BARTA (2 10^7). Le tableau n°6 montre que des dilutions successives de cette suspension n'améliore pas la sensibilité.

TABLEAU N°6 : Effet du nombre de globules rouges sur le niveau d'hémolyse

Globules rouges/ml	3,5 10^7	1,7 10^7	0,85 10^7
Hémolyse (%)	53%	55%	48%

hémolysines et complément constants.

2) Hémolysines

La quantité d'Ac sensibilisant les G.R de cobaye qui doit être utilisée dans la réaction doit permettre de réaliser le dosage du complément présent dans le lait dans des conditions optimales et notamment de mesurer de très faibles quantités de complément.

Or, la loi de suppléance de FISCHER , illustrée par la courbe de EAGLE (fig.n°4) montre que dans certaines limites hémolysines et complément se compensent mutuellement. Ceci a deux conséquences :

&) un excès d'hémolysines permettra

a) de mettre en évidence de faibles quantités de complément
b) évitera toute perturbation de la réaction par des hémolysines naturelles éventuellement contenues dans les échantillons.

Courbe de Eagle : Loi de suppléance des hémolysines et du complément (Fischer)

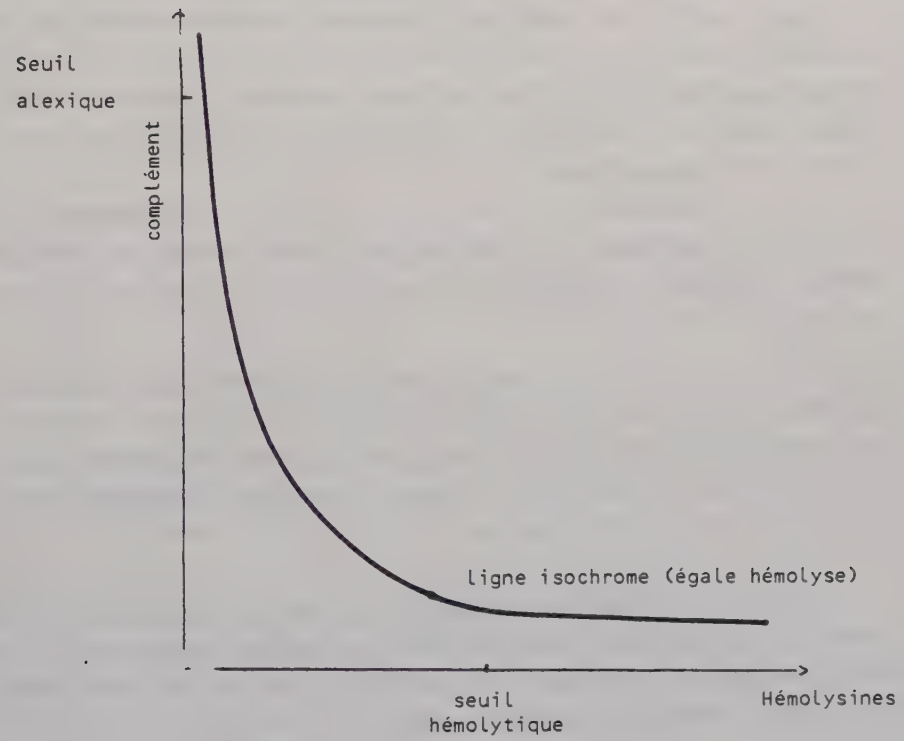


Figure n° 4

a) Il faut donc se mettre en excès d'hémolysines pour avoir une sensibilité maximale de la réaction. Il existe cependant une limite à cet excès d'hémolysines,c'est celle qui provoque l'agglutination des hématies.

En effet, l'action hémolytique du complément est inhibée par l'agglutination des hématies. La quantité optimale est donc un compromis tenant compte de ces deux impératifs. La figure n°5 montre que le mélange de sérum de lapin dilué au 32eme,d'une part contient suffisamment d'hémolysines pour lyser *toutes* les hématies, d'autre part est à une dilution infra agglutinante.

Nous avons vérifié que cette dilution correspondait bien à un excès d'hémolysines par addition de dilution de sérum de bovin décomplémenté, contenant des hémolysines naturelles (2). L'hémolyse n'a pas été modifiée.

b) L'excès d'hémolysines évite également la perturbation de l'hémolyse par les hémolysines naturelles que nous avons retrouvées dans les échantillons (figure n°6). Ceci n'est pas pour nous étonner puisqu'il existe un transfertdes Ig du sang vers le lait, transfert actif (Ig G_1) ou passif (Ig G_2) (62).

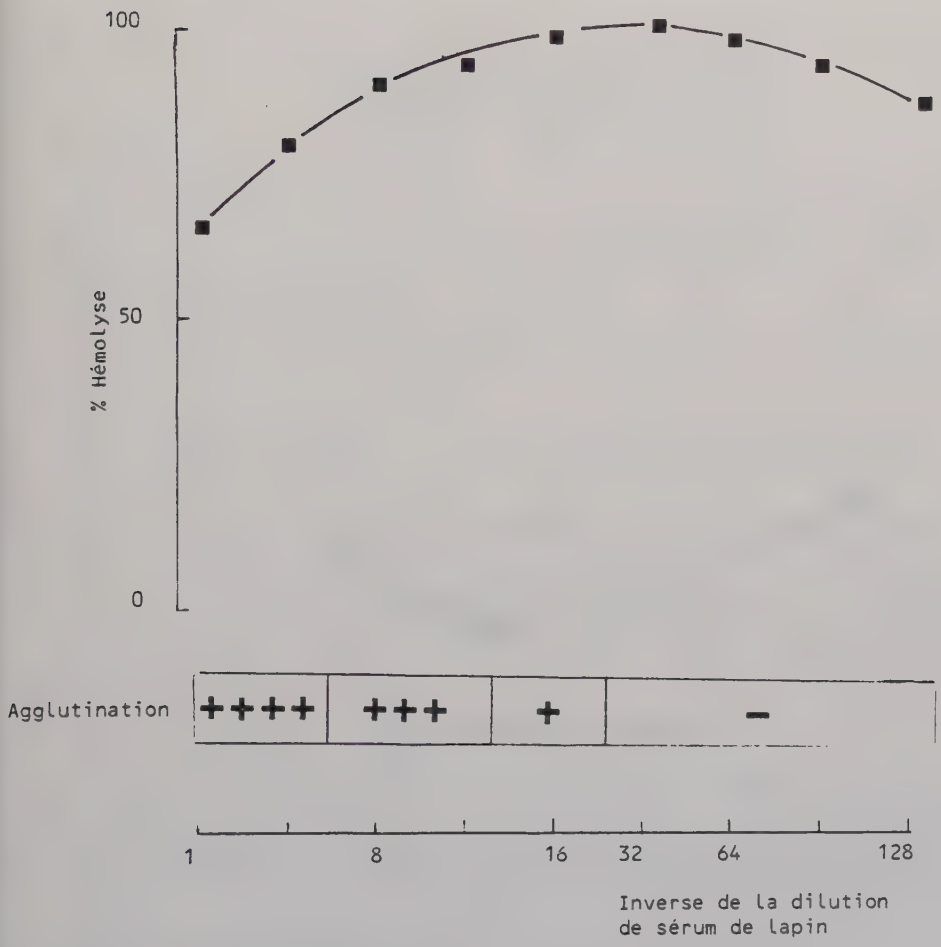
L'utilisation du mélange de sérum de lapin dilué au 32eme permet donc de se placer dans des conditions optimales pour doser de faibles quantités de complément, et ne pas être gêné par les hémolysines naturelles éventuellement contenues dans l'échantillon.

3°) Le facteur temps

MAYER (37) précise que la réaction d'hémolyse n'est terminée pour de faible quantité de complément qu'au bout de 90 mn, alors que le temps d'incubation habituellement utilisé en routine n'est que de 60 mn

Dosage agglutinant et hémolytique du sérum de lapin

antiglobule rouge de cobaye



Modification de l'hémolyse par apport de lactosérum dans un système ne comportant pas d'excès d'hémolysines

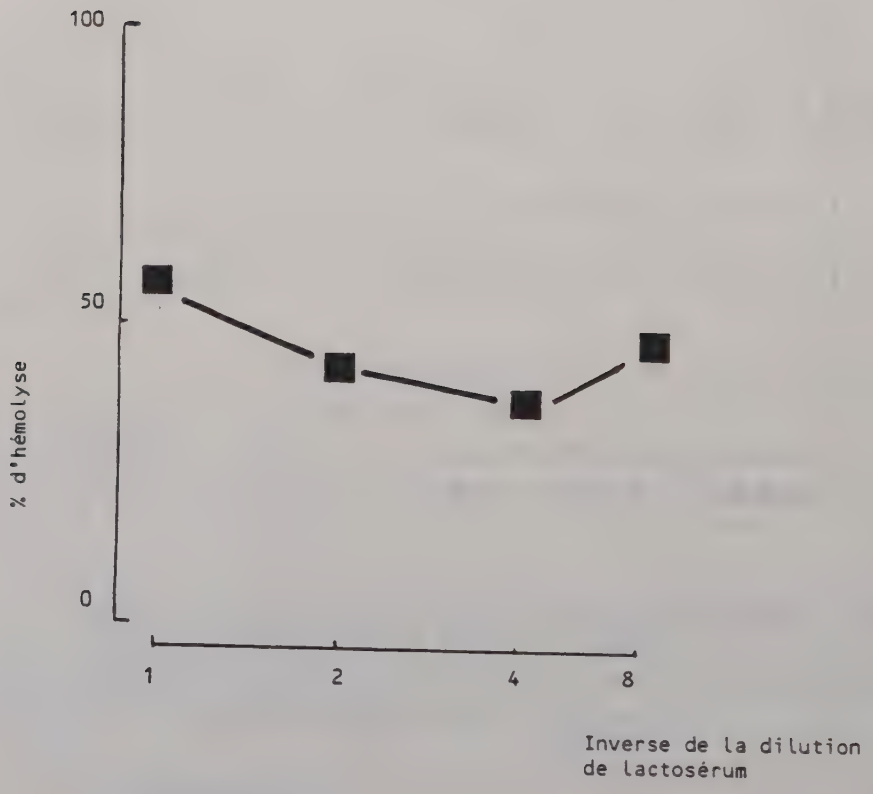


Figure n°6

à 37°C. Or, d'ultimes lyses d'hématies fragilisées, des étapes enzymatiques de l'activation du complément peuvent se produire en fin de réaction.

Nous avons comparé les résultats après 60, 90 et 120 mn d'incubation à 37°C (figure n°7); après 90 mn, le pourcentage d'hémolyse est significativement supérieur à celui correspondant à 60 mn. Par contre, il n'existe pas de différence significative entre 90 mn et 120 mn d'incubation. D'autre part, la sensibilité de la réaction n'est pas affectée par la variation du temps d'incubation.

En conséquence, l'ensemble des dosages a été effectué avec une incubation de 90 mn à 37°C.

II) CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE TURBIDIMETRIQUE

La variation des composants d'une technique ne constituent pas les seuls paramètres dont il faut tenir compte.

La valeur des résultats est conditionnée par la sensibilité, la limite inférieure de détection, la répétabilité de la technique utilisée.

1°) Sensibilité - limite inférieure de détection

Pour un système hémolytique donné, l'hémolyse est fonction de la quantité de complément. La courbe théorique est une sigmoïde (figure n°8), possédant un point d'inflexion correspondant à 50% d'hémolyse, soit pour une quantité de complément égale à l'unité 50% d'hémolyse ($1\ UH_{50}$). A ce point, situé dans la partie *linéaire* de la courbe, la pente est *maximale*. C'est donc autour de *50% d'hémolyse* que *la réaction est la plus sensible*.

Nous avons donc choisi pour doser le complément dans les sécrétions lactées de nous placer à un niveau de base égal à 50 % d'hémolyse. Dans ces conditions, la présence de complément dans l'échantillon à doser doit se traduire par un pourcentage d'hémolyse supérieur à 50%.

Activité hémolytique du complément du sérum bovin
Influence de la durée d'incubation

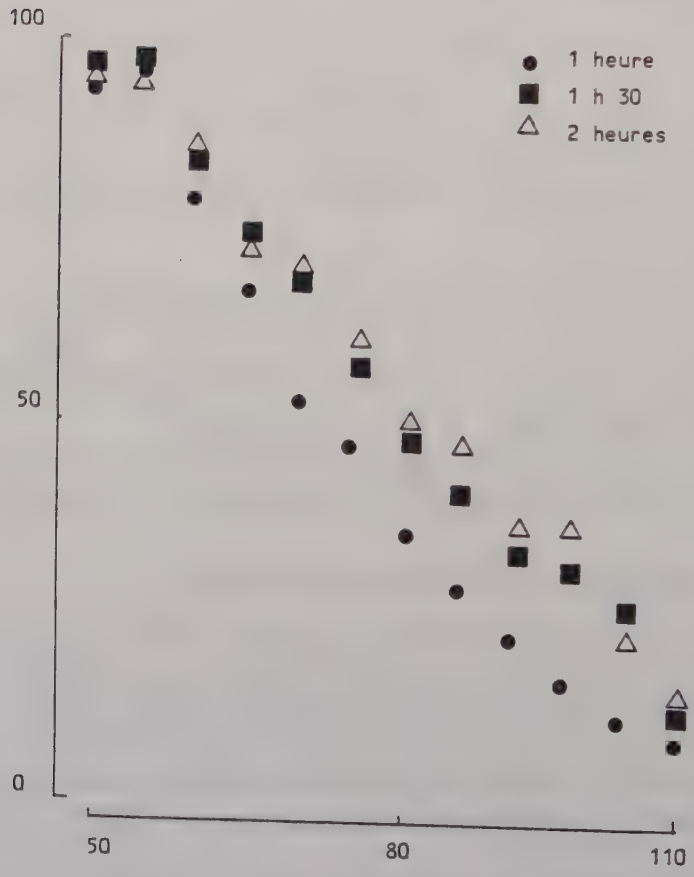


Figure n°7

Variation de l'hémolyse en fonction de
la quantité de complément

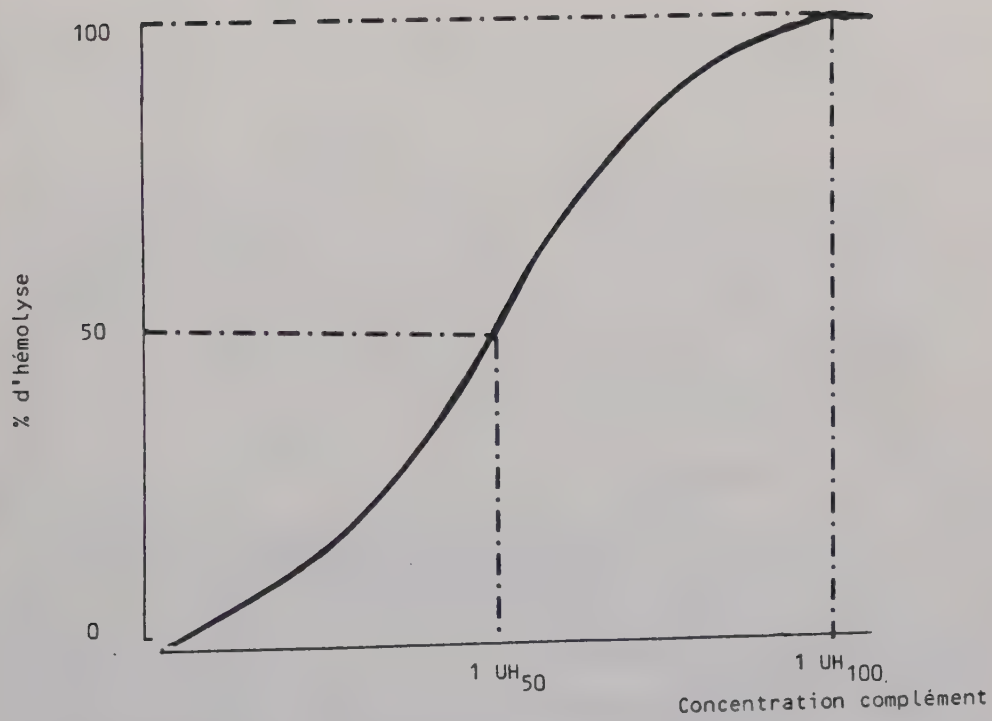


Figure n°8

Nous avons donc , dans un premier temps, dosé l'activité hémolytique d'un complément bovin (mélange de sérums bovins congelés à - 70°C) afin de pouvoir ajuster le système de manière *répétable* à 50% d'hémolyse.
La figure n°9 montre que nous avons obtenu

$$1\ UH_{100} \text{ et } 1\ UH_{50}$$

aux dilutions respectives de 1/40e et *1/80* . Le fait que 1 UH_{50} = 0,5 UH_{100} est remarquable car ceci n'est pas vérifié pour tous les systèmes. La dilution au 1/80 a été utilisée pour tous les dosages.

La sensibilité et la limite inférieure de détection ont été calculées de la façon suivante : au niveau de base correspondant à 50% d'hémolyse, nous avons rajouté des dilutions de complément bovin dans un volume correspondant à celui des échantillons à doser. La figure n°10 montre que la plus grande dilution donnant une variation mesurable de l'hémolyse,lo % , est le 1/400e, soit dans notre système :

- limite inférieure de détection

  sérum bovin au 1/400 = 0,1 UH_{100}

- sensibilité

  10% de la grandeur mesurée pour une variation de la grandeur détectée correspondant à la limite inférieure de détection

2°) Répétabilité

La répétabilité a été testée sur des quantités connues de complément (n UH_{100}), puis sur des échantillons de lactosérum. La variabilité entre les résultats des dosages réalisés sur les mêmes échantillons pour un système hémolytique donné était de 3%. Cette variabilité était de 6% pour des dosages effectués sur les mêmes échantillons avec des systèmes hémolytiques différents.

Dosage hémolytique du sérum bovin

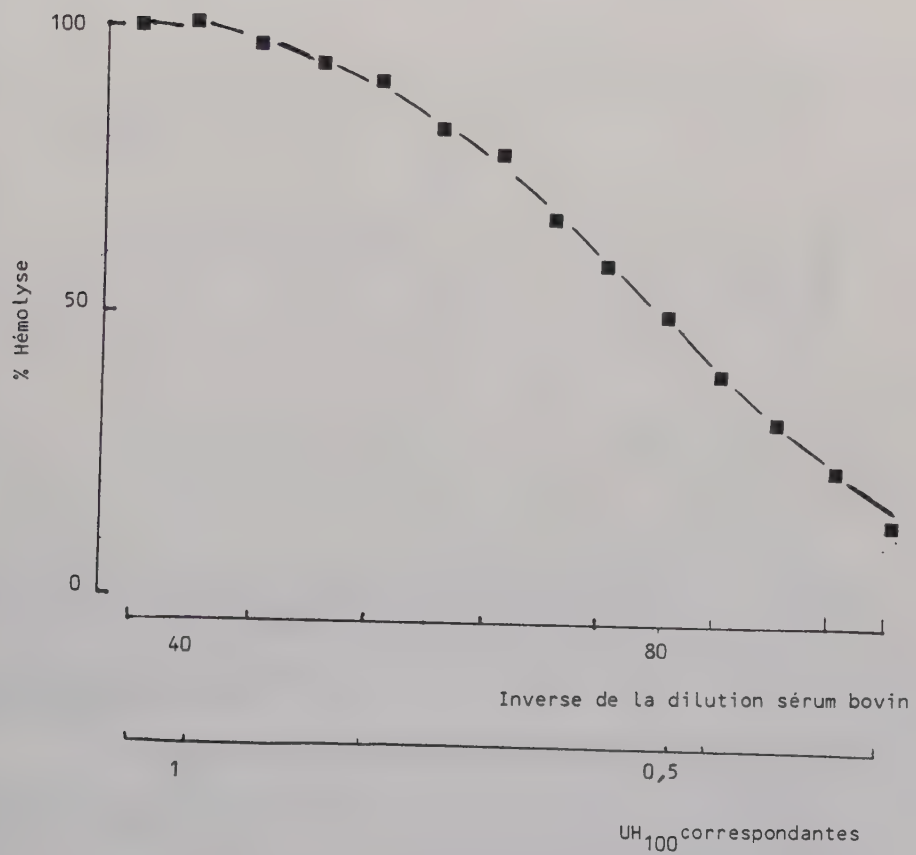


Figure n° 9

Limite inférieure de détection de la technique

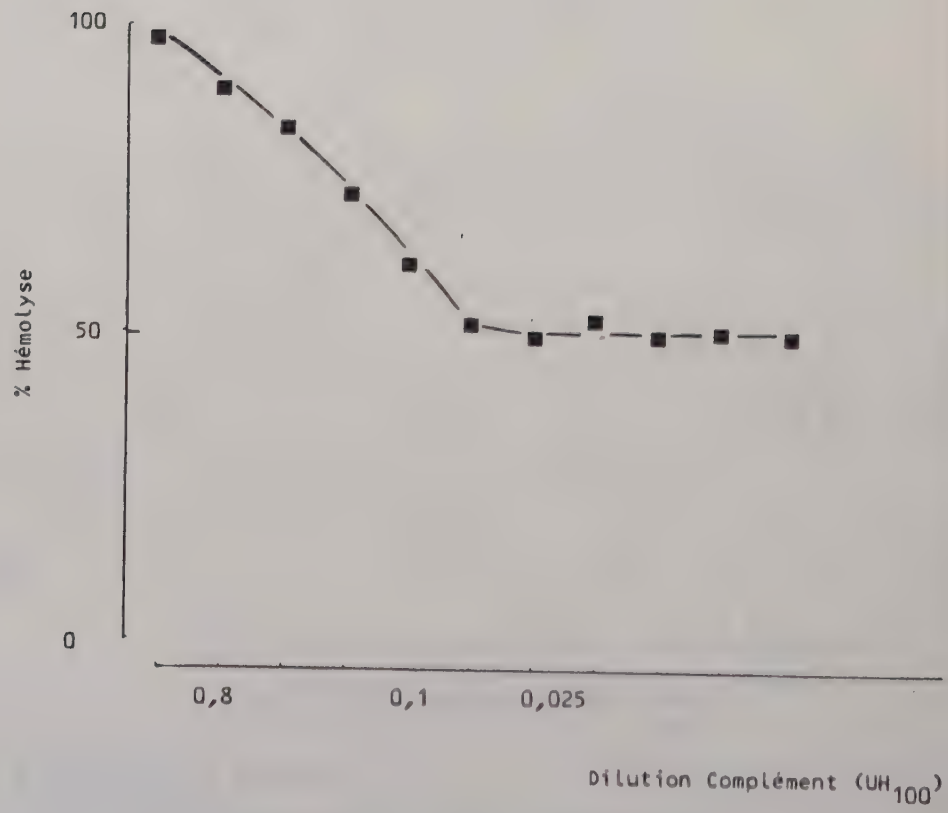


Figure n°10

La technique basée sur le principe d'une modification du niveau d'hémolyse autour des 50% s'est donc montrée sensible, reproductible et possédant une limite inférieure de détection satisfaisante pour mettre en évidence de faibles quantités de complément.

III) *TRAITEMENT DES ECHANTILLONS = ETUDE SUCCINTE DU POUVOIR ANTICOMPLEMENTAIRE. CONSEQUENCE SUR LE CHOIX D'UNE TECHNIQUE RADIO.IMMUNOLOGIQUE*

Nous avons vu que si les travaux antérieurs n'avaient pas retrouvé de complément dans le lait, trois causes pouvaient être incriminées : défaut de sensibilité de la technique (ibi supra), l'existence d'un pouvoir anti-complémentaire important, ou un traitement inadéquat des échantillons, tous les travaux ayant été effectués sur le lactosérum.

Nous avons donc voulu comparer le lait total , le lait écrémé et le lactosérum quant à leur pouvoir anti-complémentaire, pour effectuer les dosages dans les meilleures conditions. On peut, en outre, se demander si la préparation du lactosérum ne modifie pas la quantité de complément contenue dans les échantillons; dans ces conditions, l'utilisation du lait total pourrait présenter des avantages, quoiqu'alors l'appréciation de l'hémolyse ne pourrait se faire par lecture optique (absorption ou turbidimétrie), et une technique de radio-immunologie devrait être employée.

Le pouvoir anti-complémentaire d'échantillon de lait total, lait écrémé, lactosérum, provenant de quartiers sains ou infectés a été comparé (tableau n°7).

Le pouvoir anti-complémentaire du lait entier et du lait écrémé est très élevé, souvent équivalent à 1 UH_{50} (inhibition de 100 % de l'hémolyse). La précipitation par la présure lève une grande partie du pouvoir anti-complémentaire mais non sa totalité, et la dilution au 1/4 du lactosérum est insuffisante pour le lever entièrement. Une grande partie du pouvoir anti-complémentaire serait donc dûe à la caséine ou à un composant coprécipité. Bien que des différences considérables

Comparaison des pouvoirs anti-complémentaires

Vaches et quartiers	Statut infectieux	% d'inhibition de l'hémolyse								
		Dilutions lactosérum			Dilutions lait écrémé			Dilutions lait entier		
		1/1	1/2	1/4	1/1	1/2	1/4	1/1	1/2	1/4
712 A	Staph.	86	99	98	94	90	90	80	78	78
B		88	60	20	90	84	78	98	98	86
C		82	57	20	70	70	64	98	97	79
D	Staph.	50	2	2	86	84	80	100	90	88
812 A		82	48	3	79	60	69	98	94	86
B	M	80	54	45	76	76	79	100	99	84
C	Str.+M.	66	43	42	84	81	80	98	94	86
705 A								72	92	64
D	Staph.							98	82	70
708 A		84	54	18	68	64	58	98	92	80
811 A		78	48	11	72	70	66	98	94	80

Staph. : Staphylococcus aureus

Str. : streptocoque pathogène majeur

M. : staphylococcus coagulase negative (pathogènes mineurs)

TABLEAU n°7

apparaissent entre échantillons (l'inhibition variant de 2 à 98%), le *lactosérum* est donc le substrat de dosage qui gênera le moins la réaction. Cependant, comme le pouvoir anti-complémentaire n'est levé qu'à des dilutions supérieures au 1/4, c'est-à-dire à des dilutions auxquelles le complément en faible quantité n'est certainement pas détectable, *la technique*, pour chaque échantillon dilué au 1/4,*doit pouvoir tenir compte du pouvoir anti-complémentaire*.

En outre, le lactosérum étant souvent opaque, en particulier, pour les quartiers infectés, nous avons été obligés de mettre au point une technique radio-immunologique, avec marquage des globules rouges au ^{51}Cr, élément radio actif γ . Cette technique possède les mêmes caractéristiques décrites précédemment, avec toutefois une répétabilité légèrement moins bonne (7% de variabilité pour des mêmes échantillons dans des systèmes hémolytiques différents).

La mise en évidence et l'évaluation de la quantité de complément présente dans un échantillon doit se faire , à l'aide d'une *technique radio immunologique*, à partir de *la différence observée entre les pourcentages d'hémolysines* de *l'échantillon frais* (activité hémolytique) *et de l'échantillon décomplémenté* (P.A.C),et ce, en utilisant le *lactosérum*.

IV) EXPRESSION DES RESULTATS

La technique mise au point, il nous restait à définir le mode d'expression des résultats, c'est-à-dire, que nous avons voulu trouver une relation simple, linéaire, entre quantités de complément, exprimées en UH_{100} et pourcentage d'hémolyse.

Nous avons utilisé un procédé qui dérive de l'équation de VAN KROGH (1916).

(1)
$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

où :

x = quantité de complément (en unités arbitraires)
y = degré d'hémolyse en valeur décimale
(y = 1 pour 100 % d'hémolyse)
K = constante exprimant la valeur d'1 UH_{50}
1/n = constante fonction de la pente de la courbe, donc dépendant du système utilisé.

(2)
$$\text{Log } x = 1/n \text{ Log} \left(\frac{y}{1-y} \right) + \text{Log } K$$

$$\text{Log} \left(\frac{y}{1-y} \right) = n \text{ Log } x - n \text{ Log } K$$

soit :

$$\text{Log} \left(\frac{y}{1-y} \right) = a \text{ Log } x + b$$

Nous avons donc étudié la variation du logit de l'hémolyse Log y/1-y en fonction du logarithme Népérien de la quantité de complément sérique exprimé en UH_{100}.

La figure n°11 montre que nous linéarisons ainsi la relation entre complément et hémolyse. Le domaine de linéarité s'étend de 12 à 95% d'hémolyse ($3 < Y < 8$) . Cette représentation nous permet de relier directement le pourcentage d'hémolyse d'une part, calculé par turbidimétrie ou radio immunologie, à la quantité de complément correspondant d'autre

Dosage hémolytique du sérum bovin

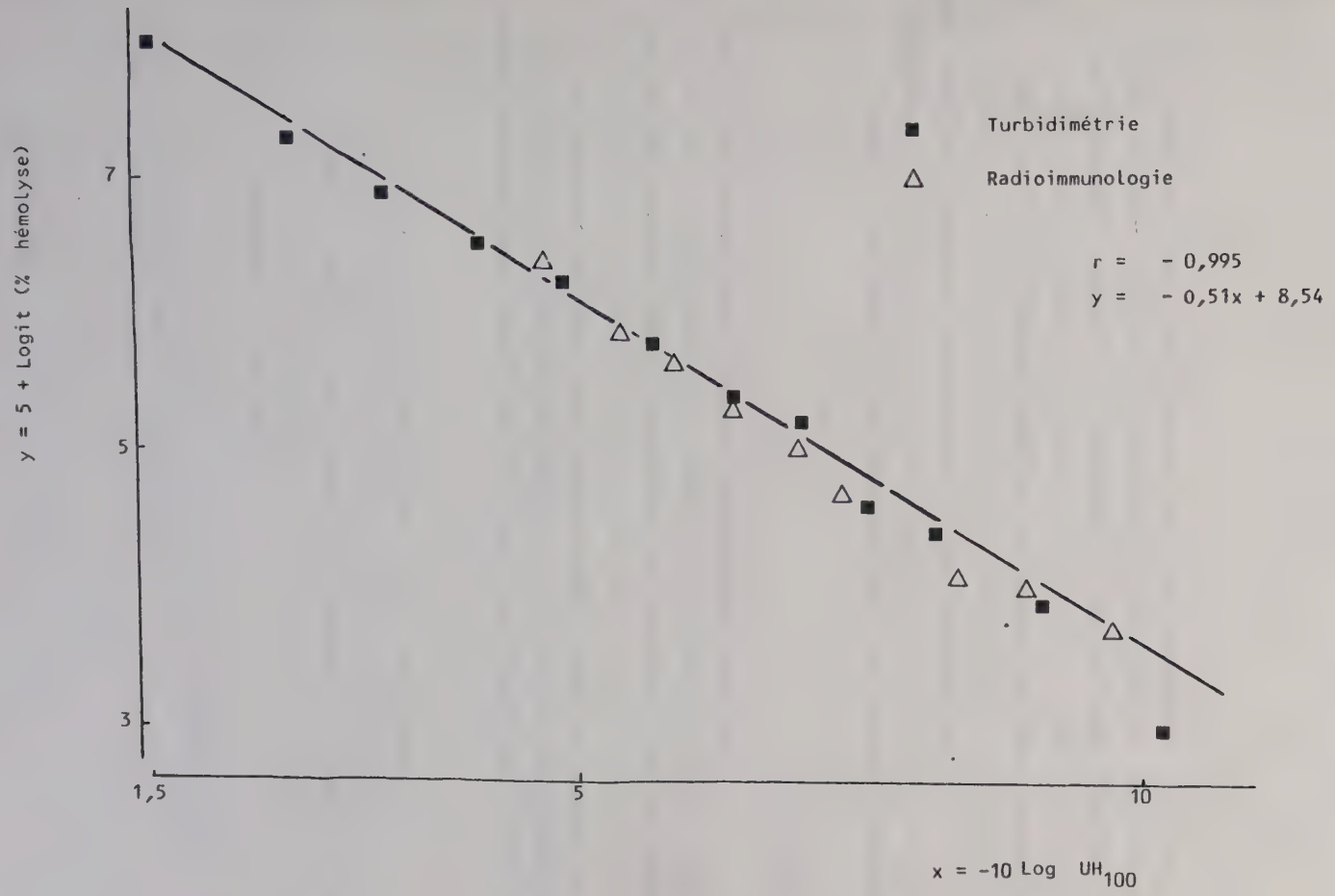


Figure n° 11

part, exprimée en UH_{100}.

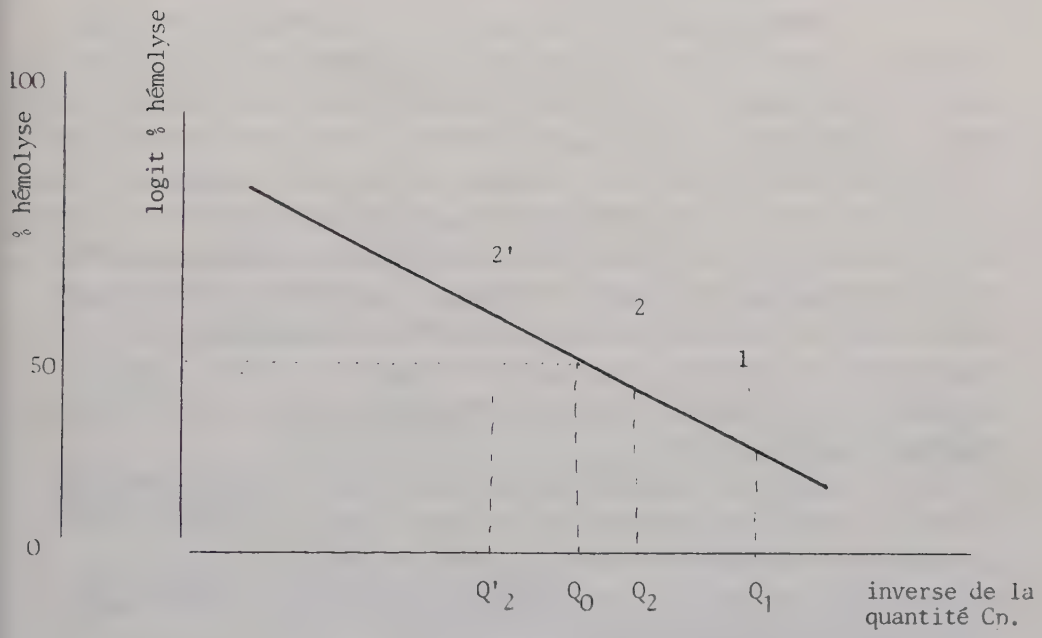
Compte tenu des résultats précédents, seule la technique radio-immunologique est utilisée. Un programme informatique a donc été réalisé (J.P.COFFIN. INRA) (annexe 2), permettant de calculer directement les quantités de complément de chaque échantillon à partir de la radioactivité exprimée en coups par minute, et, en tenant compte de la dilution de l'échantillon, ainsi que des valeurs des témoins d'hémolyse du système.

Ce programme fournit également une estimation du pouvoir anti-complémentaire calculée suivant la même loi de variation que le complément bien que le pouvoir anti complémentaire ne suive pas une loi unique.

CONCLUSION

Le dosage du complément dans les échantillons de sécrétions lactées s'est effectué par une méthode radio immunologique basée sur la comparaison des variations des pourcentages d'hémolyse autour du 50% due à l'apport de complément contenu éventuellement dans l'échantillon frais d'une part, et au P.A.C. d'autre part. Cette technique reproductible, sensible, ayant une bonne limite inférieure de détection a permis de détecter du complément dans la majorité des échantillons soumis au dosage.

Figure n°12 : Illustration du principe du dosage du complément bovin dans le lactosérum



1 : Inhibition de l'hémolyse par le PAC de l'échantillon
Q_1 : quantité théorique de complément correspondant

2 et 2' : variation de l'hémolyse correspondant à l'activité hémolytique d'un échantillon contenant peu de complément (2) ou beaucoup de complément. (2')

$Q_2 - Q_1$; $Q'_2 - Q_1$: quantité réelle de complément hémolytique contenue dans l'échantillon.

V) CRITIQUE DE LA METHODE

Rappelons que, normalement les différentes fractions du complément du pool de sérum bovin sont à des concentrations et/ ou activité variables. L'ajustement à 50% d'hémolyse est donc conditionné par la fraction dont la concentration ou l'activité est la plus faible. Dans cette hypothèse, il reste alors des fractions non consommées qui peuvent éventuellement venir compenser une absence ou une déficience de ces mêmes fractions dans l'échantillon à doser. Ce à quoi, nous pouvons répondre que des dilutions différentes de lactosérum nous ont donné des valeurs en activité hémolytique cohérentes entre elles dans 80% des cas, indiquant par là que l'hémolyse ne dépendait que des fractions contenues dans l'échantillon. Mais, il est certain que seuls des dosages de chacune des fractions séparées peuvent répondre clairement à cette question

Malgré cet inconvénient, cette technique a permis de détecter une activité totale hémolytique dans plus de 90 % des échantillons *de fin de lactation,* et de mettre en relation cette activité avec un effet bactéricide du lait, ou avec le statut infectieux de la mamelle, donnant ainsi une base biologique aux résultats

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I) *REACTIFS*

1) *Globules rouges (GR)*

a) Obtention

Du sang de cobaye est prélevé par ponction intra-cardiaque aseptique sur milieu d'Alsever, à parties égales. Il est conservé dans des flacons stériles à +4°C.

b) Ajustement à la concentration désirée

2 ml de suspension de GR sont prélevés stérilement. Ils sont lavés 3 fois par centrifugation à 2000 tours/mn pendant 5 minutes (Christ UJI Labo) . Le volume est ensuite ajusté de telle manière que 0,2 ml de la suspension finale de globules rouges, lysés dans 9,5 ml d'eau distillée donne une D.O de 0, 135 à 540 nm (spectrophotomètre Beckman DB). Ceci correspond à une concentration de 1,8 10^8 cellules/cm3.

c) Marquage

Pour la technique de radio-immunologie,les globules rouges marqués *avant dilution* par du chrome radioactif (chromium 51, Amersham UK) de la manière suivante :

2 ml de la suspension initiale sang Alsever sont prélevés stérilement et lavés trois fois dans les mêmes conditons que précédemment. Le volume est ajusté à 4 ml. 100µCi de la solution de chrome sont ajoutés.

Le tout est incubé 1 heure à 37°C en agitation permanente et douce. Puis la suspension est à nouveau lavée 3 fois dans les mêmes conditions et amenée à la concentration désirée.

2) *Hémolysines - Sensibilisation des globules rouges*

Un mélange de sérum contenant des anticorps antiglobules rouges de cobaye a été fabriqué par J.P.CAFFIN (INRA.Tours). Ce sérum est conservé à -20°C en fractions de 0,5 ml.

Il est décongelé, puis décomplémenté 1/2 heure à 56°C au bain-marie le jour de son utilisation. Il est utilisé à la dilution 1/x (pour les dosages de complément x = 32). La sensibilisation se fait en mélangeant un volume de suspension de globules rouges à un volume égal de sérum de lapin décomplémenté dilué (1/x). Le flacon est laissé 1 heure à la température du laboratoire, et agité tous les 1/4 d'heures.

Les globules rouges sensibilisés sont utilisés dans la limite d'une semaine.

3) *Complément*

Nous utilisons comme source de complément un mélange de sérums bovins.Du sang veineux est prélevé en tube sec sur 10 vaches en bonne santé du troupeau expérimental de la station. Dans l'étable, les vacutainers sont déposés dans de la glace. La coagulation se fait suivant deux procédés : une nuit à +4°C ou 1 heure à température du laboratoire. L'activité du complément est mieux conservée avec la 2eme méthode qu'avec la première

(50% d'hémolyse respectivement au 1/80e et au 1/40e).

Les vacutainers sont ensuite centrifugés à +4°C (2500tours/mn pendant 10 minutes). Le sérum recueilli est mélangé et réparti en fractions de 0,5 ml dans des tubes plastiques placés à - 70°C, ce qui est, selon ROSE (47),la meilleure façon de préserver l'activité du complément.

4) Les échantillons

Le lait est prélevé à la traite du soir. La mamelle est lavée , ce qui déclenche le réflexe d'éjection. Les 10 premiers jets sont recueillis aseptiquement dans des flacons stériles, déposés immédiatement dans de la glace pilée. Suivant le produit désiré :

- le lait est écrémé par centrifugation à +4°C (2000tours/mn 10 minutes) (Minifuge 2, Hareus Christ)
- pour le lactosérum, la caséine est précipitée par la présure, méthode qui conserverait mieux l'activité complémentaire que l'ultracentrifugation (6).

1 goutte de présure est ajoutée à 7 ml de lait écrémé. Le tube est bouché, agité, puis placé 1/2 heure à 37°C au bain-marie. Puis, il est centrifugé à 3000 tours.mn pendant 15 mn. Le surnageant (lactosérum ou colostrosérum) doit être aussi clair que du sérum sanguin.

Le colostrum et le lait de mammite clinique précipitent mal du fait de leurs particularités biochimiques. Le stockage se fait en petites fractions à -70°C.

Une partie de chaque échantillon est décomplémentée le jour de son utilisation, à 56°C pendant 1/2 heure au bain-marie.

II) TECHNIQUES

1) Réaction d'hémolyse

Des plaques à microtitrage à fond plat sont utilisées (Mikrotiterplatte F.form, Greiner, RFA).

Les réactifs sont utilisés de la manière suivante :

Pour chaque échantillon.

. Globules rouges sensibilisés	50 µl	50 µl
Sérum de bovin UH_{50}	50 µl	50 µl
Echantillon frais dilué au 1/4	25 µl	0
Echantillon décomplémenté dilué au 1/4	0	25 µl

Des témoins d'hémolyses sont effectués à chaque dosage.

	T.0 %	T.50 %	T.100 %
. Globules rouges sensibilisés	50	50	50
Tampon Mayer	75	25	0
Sérum bovin frais à la dilution contenant 1 UH_{50}	0	50	0
Sérum bovin frais à la dilution contenant 1 UH_{100}	0	0	75
	125µl	125µl	125µl

Afin de contrôler une éventuelle variabilité due à la technique, 3 dosages sont réalisés sur chaque témoin et chaque échantillon.

La plaque est recouverte d'un adhésif, agitée (AM 69 Microshaker Dynatech), puis incubée 1 h 30 avec agitation toutes les 1/2heures.

2) Mesure du degré d'hémolyse

a) Méthode turbidimétrique

La plaque est lue automatiquement immédiatement après agitation sur photomètre intégrateur enregistreur (PHI 5 , Vernon)donnant directement les pourcentages d'hémolyses de façon graphique.

Le filtre jaune (Wratten n°9) est utilisé, évitant toute interférence avec une lecture photométrique de l'hémoglobine.

b) Méthode radioimmunologique

Lors de l'utilisation de globules rouges marqués au chrome radioactif, la technique est la suivante : après agitation, la plaque est centrifugée à 2000 tours/minute,pendant 5 minutes (Labofuge III, Hareus Christ).

Puis, 50 µl de surnageant sont prélevés de chaque cupule auxquels sont ajoutés 5 ml de liquide scintillant (ACS, Amersham). La radioactivité est calculée par un compteur à radio-activité β (Rackbetta 1215, LKB) et les résultats exprimés en " coups par minute "(programme du compteur annexe 1)

Le programme informatique (annexe 2) permet de calculer à partir des coups par minute, la valeur de l'activité hémolytique et du pouvoir anticomplémentaire en unité hémolytique 100 % (HP 41, Hewlett Packard).

Troisième Partie

RÉSULTATS

Les dosages que nous avons effectués ont porté sur 2 catégories d'échantillons. Nous avons, tout d'abord, dosé le complément d'échantillons de lait sur lesquels une expérience de bactéricidie était effectuée. Puis, nous avons dosé des échantillons de sécrétions de fin de lactation (9e mois) prélevés sur les vaches du troupeau expérimental de la station.

I) RELATION BACTERICIDIE (°) -QUANTITE DE COMPLEMENT

Les résultats sont présentés en annexe 3, représentant 44 dosages.

Nous avons détecté du complément dans 96% des échantillons, mais à des titres très variables (0 à 0,46 UH_{100}). Pour 20% des échantillons, la quantité calculée est inférieure à la limite de détection théorique (0, 1 UH_{100}). Pour les vaches possédant des quartiers infectés et des quartiers sains, 66 % des quartiers infectés par des " pathogènes majeurs " ont plus de complément que les quartiers sains des mêmes vaches.

Le tableau 8 montre qu'il existe une bonne corrélation entre bactéricidie (exprimée par des pourcentages de viabilité (inférieur à 50%)) et quantité de complément.

(°) les résultats concernant la bactéricidie sont dûs à la courtoisie de P. RAYNARD (INRA.Tours)

TABLEAU N°8 = Relation bactéricidie -Quantité de complément

	Echantillon dont le titre est supérieur à 0,2 UH_{100}		Echantillon dont le titre est inférieur à 0,2 UH_{100}	
	Bactéricidie		Bactéricidie	
	+	-	+	-
Nombre	14	2	6	28
%	87,5	12,5	17,6	82,5

Par contre, il n'existe aucune corrélation entre pouvoir anti-complémentaire et la viabilité des bactéries.

Ces résultats peuvent paraître étonnants. En effet, bien que les épreuves de bactéricidie aient été effectuées sur des laits rendus acellulaires par centrifugation, le complément n'est pas le seul élément à intervenir (lactoferrine, immunoglobulines sensibilisant les bactéries..). Mais cela confirmerait l'importance biologique du complément dans les mécanismes de défenses immunitaires.

II) ECHANTILLONS DE FIN DE LACTATION

Les quartiers de *35 vaches* au neuvième mois de lactation ont été dosés. L'annexe 4 présente les résultats sur le titre en complément le titre estimé du pouvoir anticomplémentaire, la quantité de lait produite le statut infectieux, le taux de cellules somatiques, et la concentration en sérum albumine, qui est un marqueur de l'inflammation de la mamelle, ceci sur 39 vaches.

1) Relation complément- cellules somatiques

TABLEAU N°9 = Variation du titre en complément en fonction du niveau cellulaire

Cellules 10^3/ml	< 500	500.1000	1000.10000	> 10000
Complément (moyenne des quartiers) UH_{100}	0,16	0,12	0,23	0,74
σ	0,14	0,1	0,37	0,61
Nombre de quartiers	117	10	7	2

Le tableau 9 montre que le titre en complément est stable jusqu'à un niveau cellulaire égal à 1 million de cellules/ml pour augmenter de façon significative. Ce résultat doit être modéré par le fait que :

1) le nombre d'échantillons est réduit pour les deux dernières catégories
2) au sein de chaque classe, en particulier, pour les hauts niveaux cellulaires la variation est énorme = de 0 à 1,06 UH_{100} pour les quartiers ayant entre 1 et 10 millions de cellules/ml , 0,31 et 1,18 UH_{100} pour les deux quartiers ayant plus de 10 millions de cellules/ml.

2) Complément et sérumalbumine bovine (SAB)

La sérumalbumine (°) est une protéine sérique qui transsude dans les sécrétions lactées de façon passive lors d'états inflammatoires

(°) les résultats concernant la SAB sont dûs à la courtoisie du Dr.POUTREL (INRA.Tours)

locaux.

Le tableau 10 montre qu'il n'y a globalement aucune corrélation entre sérumalbumine et titres en complément.

TABLEAU N°10 = Relation entre SAB et Complément

Concentration en SAB mg/ml	> 0,2		< 0,2	
	Titre en complément (UH_{100})			
	< 0,2	> 0,2	< 0,2	> 0,2
Nombre de quartiers	66	17	50	9
%	79,5	20,5	85	15

Afin d'éliminer un éventuel facteur individuel, un calcul de corrélation a été effectué vache par vache, sur 10 vaches (063 à 233). Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence.

Même pour les titres en complément, il n'apparaît pas d'effet individuel net, puisque la différence entre quartiers d'une même vache (ayant ses 4 quartiers sains) n'est inférieure à 0,1 UH_{100} que dans 54 % des cas. C'est donc le quartier et non l'individu qui doit être pris comme unité.

3) Complément et statut infectieux

54 % des vaches ont au moins un quartier infecté, alors que seulement 22 % des quartiers sont infectés soit par des pathogènes majeurs (32%) : Staphyloccus,Streptococcus, soit par des pathogènes mineurs (Micrococcus, Corynebacterium bovis) (65%) ou par les deux (3%). Rappelons qu'un pathogène mineur est un germe susceptible d'infecter la mamelle

mais qui ne peut pas déclencher de mammite clinique.

L'analyse des résultats montre que :

. 75 % des quartiers infectés par des pathogènes majeurs (°) ont plus de complément que les autres quartiers (sains ou infectés par des pathogènes mineurs) de la même vache.

. 58 % seulement des quartiers infectés par des pathogènes mineurs ont plus de complément que les autres quartiers sains de la même vache.

Ces résultats peuvent paraître contradictoires : si le complément est significativement à un taux plus élevé lors d'infection par germes pathogènes majeurs, il n'existe pourtant aucune corrélation entre le titre en complément et un témoin de l'inflammation de la glande, la sérumalbumine.

Plusieurs raisons peuvent être avancées :

- certaines sont liées à la sérumalbumine dont la variation avec le statut infectieux ne paraît pas être un phénomène simple et linéaire,

- d'autres sont certainement liées au complément. Les propriétés biochimiques (thermolabilité élevée) et biologiques (facteurs d'activation multiples) du complément font que les résultats que nous avons trouvéspeuvent être assez éloignés de la réalité biologique. Il peut, en effet, y avoir consommation du complément par les bactéries ou les cellules présentes. D'autre part, le fait que nous ayons trouvé en quantité parfois importante du complément dans les premiers jets, parfois en place depuis plusieurs heures dans la citerne de la mamelle, laisse à penser que le renouvellement (turn over) du complément doit être assez rapide. Pour le moment, rien n'est connu sur le mode de transport des fractions du complément du sang vers la glande. Une synthèse locale est peu probable mais possible.

(°) le quartier infecté par un streptocoque et un microcoque est compté dans ce chiffre.

Conclusion

La technique de radio-immuno- hémolyse mise au point a permis de détecter du complément dans plus de 90 % des échantillons infirmant les travaux précédemment publiés. Le pouvoir anti complémentaire important des sécrétions lactées a pu être mis en évidence sans que le rôle biologique soit révélé.

S'il existe une bonne corrélation entre complément et bactéricidie, et entre complément et infection de pathogènes majeurs , nombreux sont les points qui demeurent obscurs : passage sélectif ou non du sang dans la mamelle, importance relative des différentes fractions.

Néanmoins, le complément apparaît avoir un rôle important dans la bactéricidie et donc dans l'immunité mammaire. La connaissance plus approfondie de ses propriétés in situ doit être un des éléments qui permettent la compréhension des mécanismes immunitaires et donc la protection de la mamelle vis-à-vis des agents bactériens pathogènes.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire rapporteur

Professeur TAINTURIER

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : Le Président de la Thèse

Professeur DUCOS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 19-4-1982
LE Président de l'Université
Paul Sabatier

Professeur D. BANCEL

ANNEXE 1 : Programme du compteur à radioactivité

```
                                P
     PARAMETER GROUP            4
     ID : CR 51
     LINE ⟶

01   MODE 3
02   TIME 00300
03   COUNTS 010000
04   LCR 0000
05   HCR 1
06   BG 1 0000
07   BG 2 0000
08   CH 1 008-140
09   CH 2 010-140
10   CH 3 100-135
11   CH 4 135-184
12   STD TIME 030
13   PRINT 01.02.03.05.04
14   REP 01
15   EFF 1% RATIO


     PASO
```

ANNEXE 2 : Programme informatique de calcul des quantités de complément en UH_{100}

(Calculatrice HP 41)

Mémoires statiques

Stock 00 = 0,51
01 = 8,54 voir figure n°11

02 = valeur de la différence 100% d'hémolyse - 0 % d'hémolyse en coups par minute (C.P.M)

03 = Valeur du 50 % d'hémolyse en C.P.M

04 = Valeur du 0 % d'hémolyse en C.P.M.

Mémoires dynamiques

Numéro de la vache
Dilution de l'échantillon
Valeur moyenne de l'échantillon décomplémenté en C.P.M
Valeur moyenne de l'échantillon frais en C.P.M.

ANNEXE 2 : Programme informatique pour le calcul des UH_{100}

```
01*LBL "UCMPL"
   02 FIX 0
   03 VIEW Y
   04 VIEW X
   05 VIEW T
   06 VIEW Z
   07 ADV
   08 FIX 2
   09 RCL T
   10 STO 06
   11 RCL T
   12 STO 07
   13 RCL Z
   14 STO 08
   15 RCL 07
   16 XEQ 01
   17 STO 09
   18 RCL 05
   19 X<>Y
   20 -
   21 RCL 03
   22 *
   23 VIEW X
   24 RCL 06
   25 XEQ 01
   26 RCL 09
   27 -
   28 RCL 08
   29 *
   30 VIEW X
   31 ADV
   32 ADV
   33 RTN

   34*LBL 01
   35 RCL 04
   36 -
   37 RCL 02
   38 X<>Y
   39 -
   40 LASTX
   41 X<>Y
   42 /
   43 LN
   44 5
   45 +
   46 RCL 01
   47 -
   48 RCL 00
   49 /
   50 10
   51 /
   52 E↑X
   53 RTN
   54 END
```

```
PRP "UH 50"

01*LBL "UH 50"
   02 RCL 04
   03 -
   04 RCL 02
   05 X<>Y
   06 -
   07 LASTX
   08 X<>Y
   09 /
   10 LN
   11 5
   12 +
   13 RCL 01
   14 -
   15 RCL 00
   16 /
   17 10
   18 /
   19 E↑X
   20 STO 05
   21 END
   PRP "UCMPL"
```

ANNEXE 3 : Mesure des titres en complément et pouvoir anti-complémentaire d'échantillons de fin de lactation en fonction du statut infectieux et du pouvoir bactéricide

Vache et quartiers		C(°)	P.A.C (°)	I (°°)	Viabilité(&)
510	A	0,36	0,34	Staphyl.	< 1
	B	0,46	0,56	Staphyl.	2
	C				
	D				
607	A	0,37	0,62	-	< 1
	B	0,13	0,1	Staphyl.	< 1
	C				
	D				
810	A	0,33	0,56	Strept.	< 1
	B				
	C	0,21	0,83	-	140
	D	0,14	0,42	M	180
407	A	0,25	0,17	Pseud.	< 1
	B	0,2	0,35	-	15
	C	0,1	0,37	-	130
	D	0,25	0,45	-	50
712	A				
	B	0,05	0,16	-	120
	C	0,06	0,17	-	110
	D	0,46	0,1	Staphyl.	<10

Vache et quartiers		C	PAC	I	Viabilité
	A	0,05	0,27	M	70
	B	0,1	0,22	Strept.	5
916	C	0,08	0,32	-	90
	D	0,15	0,4	-	80
	A	0,05	0,35	-	25
	B	0,2	0,37	M	10
910	C	0,27	0,37	CB	10
	D	0,13	0,42	CB	2
	A	0,05	0,49	-	130
	B	0	0,19	M	100
802	C	0,08	0,3	-	120
	D	0,1	0,27	-	80
	A	0,1	0,1	-	80
	B	0,05	0,13	M	20
812	C	0,26	0,29	M +Strept.	3
	D	0,1	0,17	M	5
	A	0,29	0,43	CB	50
	B	0,35	0,56	M	40
813	C	0,25	0,14	M	50
	D	0,14	0,60	-	70
	A	0,16	0,47	Staphyl.	180
	B	0,12	0,44	Staphyl.	130
412	C	0,14	0,51	-	160
	D	0,1	0,31	-	130

Vache et quartiers		C	PAC	I	Viabilité
	A				
	B	0,23	0,39	Staphyl.+Strep	160
224	C	0,17	0,35	-	170
	D	0,12	0,4	-	
	A	0,15	0	-	130
	B	0,12	0,2	-	120
705	C	0,17	0,13	-	140
	D				

- = échantillon stérile

Staphyl. = *Staphylococcus aureus*

M = Micrococaccae coagulase négative

Strept = Streptococcus

P = Pseudomonas

CB = *Corynebacterium bovis*

C (°) = Complément) et PAC(°) = pouvoir anticomplémentaire en UH_{100}

I (°°) = Statut infectieux

Viabilité (&) = pourcentage de viabilité d'une souche d'E.coli dans l'échantillon.

ANNEXE 4 : Dosage du complément dans des échantillons de fin de lactation en fonction du statut infectieux, du niveau cellulaire et de la sérumalbumine.

Légendes des tableaux ci-dessous

N =numéro de la vache x = date du vêlage y = date du prélèvement

C = titre du complément (UH_{100})

PAC : titre en pouvoir anti complémentaire (UH_{100})

Q = quantité de sécrétion recueillie le jour du prélèvement (en litres)

I = statut infectieux

S = Staphylococcus aureus

Str = Streptococcus pathogènes majeurs

CB = Corynebacterium bovis

M = Micrococcacae " coagulase négative " (pathogènes mineurs)

E = Quelques colonies

TC : taux cellulaires (x 10^3cellules/ml)

SAB = concentration en sérum albumine bovine (mg/ml)

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
17/9 -17/6 - 063 (x) (y) (N)	C	0,09	0,2	0,14	0,05
	PAC	0,25	0,46	0,16	0,16
	Q	1,05	0,3	0,5	1,6
	I	-	Str+S	E^S +S	S
	TC	128	*1255*	393	515
	SAB	0,145	0,32	0,15	0,24
25/2- 7/11 - 102	C	0,3	0,31	0,11	1,18
	PAC	0,7	0,36	0,63	1,52
	Q	0,4	0,8	1,2	0,4
	I	-	S	-	E^S +S
	TC	699	*17458*	S+19	*10824*
	SAB	0,41	1,4	0,31	0,54
11/1 - 12/10 - 206	C	0,15	0,05	0,05	0,08
	PAC	0,43	0,32	0,24	0,33
	Q	0,85	0,8	0,85	1,45
	I	-	-	-	-
	TC	277	473	494	181
	SAB	0,28	0,25	0,38	0,33
12/12 - 12/9 - 210	C	0,12	0,07	0,o2	0,13
	PAC	0,2	0,33	0,12	0,14
	Q	1,1	1,35	1,05	0,45
	I	Str	CB	CB	Str+M
	TC	375	278	155	151
	SAB	0,12	0,15	0,18	0,21
20/2 - 20/11 - 214	C	0,06	ND	0,19	0
	PAC	0,38	ND	0,38	0,2
	Q	0,8	0,8	0,75	1,1
	I	CB	CB	CB	-
	TC	?	?		
	SAB	0,18	0,21	0,26	0,2

Dates et n° de la vache		A	B	C	D
21/12 - 21/9 - 215	C	0,08	0,1	0,23	0,12
	PAC	0,25	0,2	0,25	0,31
	Q	0,35	0,8	0,25	0,65
	I	-	-	CB	-
	TC	285	183	318	145
	SAB	0,3	0,24	0,37	0,27
12/11-10/8 - 222	C	0,25	ND	0,12	0,06
	PAC	0,37	ND	0,33	0,5
	Q	0,4		0,4	0,45
	I	-		-	M
	TC	167		184	*1219*
	SAB	0,18		0,2	0,37
17/12- 18/09 - 224	C	0,03	0,08	ND	0,12
	PAC	0,23	0,05	ND	0,06
	Q	0,63	0,9	0,6	1,2
	I	-	Str	-	-
	TC	231	607	315	227
	SAB	0,165	0,18	0,2	0,2
14/10 - 11/07 - 230	C	0,26	1,3	0	1,06
	PAC	0,5	1,53	0	1,53
	Q	0	0	0	0
	I	-	-	CB	-
	TC	326	445	*1131*	*1376*
	SAB	0,064	0,2	0,29	0,31

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
13/10 - 17/07 - 233	C	0,05	0,1	0,14	0,19
	PAC	0,16	0,12	0,17	0,18
	Q	0,75	0,58	0,55	1
	I	-	-	-	-
	TC	225	235	172	278
	SAB	0,18	0,18	0,23	0,2
15/02 - 16/11 - 234	C	0	0,04	0	ND
	PAC	0	0,01	0	ND
	Q	0,75	1,3	0,8	1,8
	I	-	S	CB	CB
	TC	508	1291	514	496
	SAB	0,2	0,13	0,135	0,18
21/01 -19/10 - 401	C	0,13	0,14	0,21	0,14
	PAC	0,35	0,27	0,16	0,29
	Q	0,7	1,25	0,65	0,85
	I	-	-	-	-
	TC	438	545	379	420
	SAB	0,16	0,18	0,17	0,21
02/04 - 04/01 - 402	C	0,13	0,22	0,26	0,11
	PAC	0,46	0,44	0,46	0,35
	Q	0,55		0,9	1,2
	I	M	Str	CB	Str
	TC	133	689	380	1041
	SAB	0,45	0,53	0,55	0,56
22/03 - 19/12 - 407	C	0,1	ND	0,09	0,12
	PAC	0,06	ND	0,02	0,2
	Q	0,65		0,4	1,15
	I	-		-	M
	TC	94		249	275
	SAB	0,21		0,22	0,29

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
26/12 - 23/09 - 411	C	0,15	0,18	0,15	0,16
	PAC	0,47	0,29	0,39	0,31
	Q	0,65	0,65	0,6	1,05
	I	-	M	-	-
	TC	248	396	185	156
	SAB	0,21	0,2	0,13	0,18
02/02 - 30/10 - 412	C	0,17	0,4	0,14	0,11
	PAC	0,13	0,3	0,21	0,11
	Q	0,38	0,8	0,1	0,7
	I	-	-	-	-
	TC	563	193	265	437
	SAB	0,22	0,22	0,09	0,18
05/05 -08/02 - 413	C	0,03	0,19		
	PAC	0,05	0,33		
	Q	0,8	1		
	I	-	-		
	TC	?	?		
	SAB	0,3	0,44		
07/04 - 09/01 - 415	C	0,44	0,24	0,07	0,23
	PAC	0,52	0,49	0,58	0,61
	Q	0,8	1,2	0,95	1,25
	I	-	-	-	-
	TC	194	99	96	130
	SAB	0,28	0,37	0,28	0,24
07/01 - 09/10 - 432	C	0,1	0,18	0,15	0,15
	PAC	0,24	0,43	0,24	0,31
	Q	0,6	1,15	0,55	0,9
	I	-	-	-	M
	TC	258	57	108	142
	SAB	0,08	0,17	0,12	0,2

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
14/12 - 14/09- 435	C	0,06	0,28	0,030	0,09
	PAC	0,43	0,71	0,42	0,4
	Q	0,9	0,95	0,95	1,1
	I	-	-	-	-
	TC	153	195	196	393
	SAB	0,15	0,135	0,115	0,145
04/01 - 05/10 - 437	C	0,11	0,12	0,19	0,09
	PAC	0,51	0,62	0,73	0,41
	Q	0,6	0,6	0,8	1,5
	I	M	CB	M	-
	TC	130	89	112	57
	SAB	0,14	0,25	0,16	0,2
28/12 - 28/09 - 438	C	0,05	0,11	0,1	0,19
	PAC	0,4	0,4	0,24	0,4
	Q	0,65	1,05	0,7	1,3
	I	-	-	-	-
	TC	275	149	134	206
	SAB	0,23	0,2	0,2	0,2
22/12 - 21/09 - 445	C	0,15	0,13		
	PAC	0,61	0,68		
	Q	0,65	0,95		
	I	-	M		
	TC	94	114		
	SAB	0,14	0,2		
04/01 - 05/10 - 446	C	0,12	0,12	0,07	0,23
	PAC	0,31	0,38	0,33	0,2
	Q	0,5	0,65	0,45	0,7
	I	-	-	-	-
	TC	147	71	65	58
	SAB	0,16	0,27	0,2	0,31

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
09/03 - 07/12 - 477	C	0,15	0,05	0,13	
	PAC	0,61	0,69	0,39	
	Q	1,15	1,75	0,95	
	I	-	-	-	
	TC	136	134	77	
	SAB	0,18	0,28	0,2	
11/01 - 12/10 - 501	C	0,16	0,07	0,05	0,15
	PAC	0,39	0,19	0,27	0,27
	Q	0,5	1,1	0,55	1,35
	I	-	-	-	-
	TC	223	191	456	252
	SAB	0,2	0,23	0,2	0,24
09/11 - 02/08 - 503	C	0,05	0,14	0,06	
	PAC	0,19	0,22	0,06	
	Q	0,5	0,75	0,45	
	I	-	-	-	
	TC	300	354	340	
	SAB	0,19	0,17	0,18	
09/11 - 10/06 - 504	C	0	0	0	0,05
	PAC	0	0	0	0
	Q	0,65	0,9	0,55	0,9
	I	-	-	-	-
	TC	276	199	442	281
	SAB	0,18	0,06	0,115	0,115
09/11 - 08/08 - 505	C	0,14	0,19	0	0,48
	PAC	0,24	0,14	0	0,39
	Q	0,5	0,75	0,5	0,85
	I	-	-	-	-
	TC	119	140	156	103
	SAB	0,28	0,2	0,27	0,30

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
26/01 - 26/10 - 506	C	0,4	0,06	0	0,1
	PAC	0,17	0,26	0	0,1
	Q	0,9	0,9	0,95	1,3
	I	-	-	-	-
	TC	117	146	171	419
	SAB	0,17	0,185	0,17	0,17
30/10 - 03/07 - 507	C	0,15	0,1	0,07	0,1
	PAC	0,21	0,07	0,18	0,21
	Q	0,85	1,25	1	1,25
	I	-	-	-	-
	TC	196	157	166	209
	SAB	0,155	0,25	0,19	0,23
20/11 - 21/08 - 508	C	0,19	0,6	-	0,08
	PAC	0,03	0,12	-	0,15
	Q	0,45	0,68		0,83
	I	-	-		-
	TC	113	145		200
	SAB	0,16	0,23		0,25
21/01 - 19/10 - 510	C	0,2	0,17	0,23	0,23
	PAC	0,21	0,51	0,39	0,53
	Q	0,7	1,4	0,85	0,9
	I	-	-	-	-
	TC	351	541	282	237
	SAB	0,13	0,10	0,1	0,115
11/01 - 12/10 - 602	C	0,04	0,19	0,29	0,18
	PAC	0,15	0	0,3	0,35
	Q	0,85	1,4	1,1	0,9
	I	-	-	-	-
	TC	316	344	141	223

Dates et n°de la vache		A	B	C	D
05/04 - 28/12 - 603	C	0,04	0,1	0,11	0,17
	PAC	0,18	0,16	0,04	0,25
	Q	0,5	0,8	0,48	1
	I	M	M	-	M
	TC	154	229	116	447
	SAB	0,25	0,38	0,42	0,34
11/02 - 13/11 - 604	C	0,06	0,11		0,14
	PAC	0,21	0,2		0,16
	Q	0,8	1,05		1,05
	I	-	-		-
	TC	164	160		144
	SAB	0,35	0,5		0,45
08/01 - 09/10 - 605	C	0,04	0,08		0,38
	PAC	0,54	0,5		0,44
	Q	0,75	1,05		1,1
	I	-	-		-
	TC	69	88		159
	SAB	0,115	0,135		0,135
26/11 - 28/08 - 607	C	0,27		0,35	0,21
	PAC	0,36		0,47	0,39
	Q	0,1		0,1	0,55
	I	-		-	-
	TC	442		218	193
	SAB	0,23		0,20	0,18
29/01 - 26/10 - 951	C	0,11	0,18	0,19	0,14
	PAC	0,08	0,27	0,22	0,18
	Q	0,6	1,3	0,55	1,05
	I	-	-	S	-
	TC	181	131	4344	290
	SAB	0,33	0,33	0,4	0,365

BIBLIOGRAPHIE

(1) BACH (J.F) - Immunologie, Flammarion edt. Paris, 1976

(2) BARTA (O), BARTA (V) - Haemolytic assay of bovine complement - J.Immunol. Methods , 1972, 1 , 363.374

(3) BARTA (O) , BARTA (V) - Haemolytic and conglutinating complement in bovine serum - Zentbl. Vet.Med. 1973,20B, 71.82

(4) BOOTH (N.A), CAMPBELL (R.D), FOTHERGILL (J.E) - The purification and characterization of bovine C_4, the fourth component of complément - Biochem. J. 1977, 177, 959.965

(5) BOOTH (N.A.), CAMPBELL (R.D.), SMITH (M.A.), FOTHERGILL (J.E.) - The isolation and characterization of bovine C_4a, an activation fragment of the fourth component of complement - Biochem. J. 1979, 183, 573.578

(6) BROCK (J.H), ORTEGA (F), PINEIRO (A) - Bactericidal and Haemolytic activity of complement in bovine colostrum and serum : effect of proteolytic enzymes and ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA) Am. Immunol. 1915, 126C , 439.451

(7) CAMPBELL (R.D), BOOTH (N.A), FOTHERGILL (J.E) - Purification and characterization of subcomponent C_1q of the first component of bovine complement - Biochem. J. 1979, 177, 531.540

(8) CAMPBELL (R.D), BOOTH (N.A), FOTHERGILL (J.E) - The purification and characterization of sub component C_1s of the first component of bovine complement - Biochem. J. 1979, 183, 579.588

(9) COLTEN (H.R) - Biosynthesis of serum complement - in Progress in Immunology 1974 , II, vol.1, 183.190 - edité par L.Brent & J. Holborow, North. Holland Publishing Company, Amsterdam,Holland

(10) De CUENINCK (B.J.) - C_{142} complement activity and conglutinogen in bovine milk - Int. Archs. Allergy & Apply Immun. 1979, 59, 323.327

(11) De CUENINCK (B.J) - Immune mediated inflammation in the lumen of the bovine mammary gland - Int. Archs. Allergy & Apply Immunol. 1979, 59, 394.402

(12) DODD (F.H), JACKSON (E.R) - The control of bovine mastitis - Uniwin Brothers, ltd. London, 1971

(13) ECKBLAD (W.P), HENDRIX (K.M), OLSON (D.P) - Total complement activity of colostral whey and sera from dairy cows- Cornell Vet. 1981 ,71, 54.58

(14) GOLDSTEIN (I.M) , BRAI (M), OSLER (A.G.), WEISSMANN (G) - Lysosomal enzyme release from human leukocytes. Mediation by the alternative pathway of complement activation - J.Immunol. 1973, 111 , 33.37

(15) GOTZE (O), MULLER.EBERHARD (H.J) - The alternative pathway of complement activation - Adv. Immunol. 1976, 24, 1.35

(16) HARMON (R.J), SCHANBACHER (F.L), FERGUSON (L.C), SMITH (K.L)- Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occuring during mastitis - Am.J.Vet.Res. 1975, 36, 1001-1007

(17) HILL (I.R), PORTER (P) - Studies of bactericidal activity to Escherichia coli of porcine serum and colostral immunoglobulins and the role of lysosyme with secretory Ig A - Immunolgy, 1974, 26, 1293.1301

(18) JAIN (N.C), SCHALM (O.W), CARROLL (E.J), LASMANIS (J) - Experimental mastitis in leukopenic cows . Immunologically induced neutropenia and response to intramammary inoculation of Aerobacter aeruginosa - Am.J.Vet.Res. 1976, 37, 885.890

(19) KAKOMA (I) , KINYANSUI (M) - Complement levels of normal cattle - Res.Vet. Sci. 1974, 16,395-397

(20) KENT (G.M), NEWBOULD (F.H.S) - Phagocytosis and related phenomena in polymorphonuclear leukocytes from cow's milk - Can.J.Comp. Med. 1969, 33, 214.219

(21) LACHMANN (P) - Conglutinin and immunoconglutinin - Adv. Immunol. 1967, 6, 479.527

(22) LEIJH (P.C.J), VAN DEN BARSELAAR (M.T), DAHA (M.R), VAN FURTH (R) - Participation of immunoglobulins and complement components in the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes - Infection & Immunity 1981, 33, 3, 714.724

(23) LEIST.WELSH (P), BJORNSON (A.B) - Requirements of immunoglobulins and the classical and alternative complement pathways for phagocytosis and intracellular killing of multiple strains of gram negative aerobic bacilli - Infection & Immunity, 1979, 26, 99.109

(24) MC DOWELL (G.H), LASCELLES (A.K) - Local immunisation of ewes with staphylococcal cell and cell toxoid vaccines - Res. Vet. Sci. 1971, 12, 258.264

(25) MC DOWELL (G.H), WATSON (D.L) - Immunity to experimental staphylococcal mastitis:comparison of local and systemic immunisation - Aust.Vet.J. 1974,50, 533.536

(26) MACKENSIE (D.D.S), LASCELLES (A.K) - The transfer of (^{131}I) labelled immunoglobulins and serum albumin from blood into milk of lactating ewes - Aust. J.Exp. Biol.Med.Sci. 1968, 46, 285.294

(27) MAYER (A) - Studies on the mechanism of hemolysis by antibody and complement - Progress in Allergy, 1958, 5, 215.221

(28) MULLER.EBERHARD (H.J) - Complement - Ann. Rev.Biol. 1975, 44,697.724

(29) NAIDU (T.C),NEWBOULD (F.H.S) - Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk - Can.J.Comp.Med. 1973, 37, 47.51

(30) NEWBOULD(F.H.S),NEAVE (F.K) - The recovery of small numbers of *Staphylococcus aureus* infused into the bovine teat cistern - J.Dairy Res. 1965, 32, 157.162

(31) NORCROSS (N.L)-Immune response of the mammary gland and role of immunization in mastitis control - J.A.V.M.A. 1977, 170, 1228-[illegible]

(32) PANG (A.S.D), ASTON (W.P) - The alternative pathway in bovine serum : the isolation of a serum protein with factor B activity - Immunochemistry, 1978, 15, 529.534

(33) PAAPE (M.J), SCHULTZE (W.D), GUIDRY (A.J), KORTUM (N.M), WEINLAND (B.T) Effect of intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocytes response to *Escherichia coli* endotoxin and challenge exposure with *Staphylococcus aureus*- Am.J.Vet.Res. 1981, 42 , 774.783

(34) PEPYS (A.P) - Role of complement in induction of immunological responses - Transplant. Rev. 1976, 32, 93.101

(35) PLOMMET (M), LE LOUEDEC (C) - Les mammites de la vache - in Les mammites animales et leur incidence sur l'économie globale - Edition S.D.E.I. 1972, 275.281

(36) RAYNARD (P) - Communication personnelle

(37) REITER (C), ORAM (J.B) - Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids - Nature, 1967, 216, 328.330

(38) REITER (B), BROCK (J.H) - Inhibition of Escherichia coli by bovine colostrum and post-colostral Milk. I. Complement mediated bactericidal activity of antibodies to a serum susceptible strain of E.coli of the serotype O 111 - Immunology, 1975, 28, 71.82

(39) REITER (B) - Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum - Am.Rech. Vet.1978, 9 , 205.224

(40) RENSHAW (H.W), ECKBLAD (W.P), TASSINARI (P.D), EVERSON (D.O) - Levels of total haemolytic complement activity in paired dairy cow-newborn calf sera - Immunology, 1978, 34, 801.805

(41) RICE (C.E.), BOULANGER (C.P) The interchangeability of the complement components of different animal species.II. in Haemolysis of sheep erythrocytes sensitized with rabbit amboceptor - J. Immunol. 1952, 68, 197.206

(42) RICE (C.E.), DUHAMEL (C) - A comparison of the complement conglutinin and natural antisheep red cell antibody titers of serum of newborn and older calves - Can.J.Comp.Med. 1957, 21,109.116

(43) ROGUINSKY - 1968, (non publié)

(44) ROSE (J.E.), AMERAULT (T.E), ROBY (T.O),MARTIN (W.H) - Serums levels of conglutinin complement and immunoconglutinin in cattle infected with Anaplasma marginale - Am.J.Vet.Res. 1978, 39, 791-793

(45) ROSE (J.E), AMERAULT (T.E), ROBY (T.O)- Complement activity and conglutinin activity in stored bovine sera - Am.J.Vet.Res.1979, 40, 421.422

(46) RUSSELL (M.W), REITER (B) - Phagocytic deficiency of bovine milk leucocytes : an effect of casein - J.Reticuloendothel. Soc. 1975, 18, 1.13

(47) SCHALM (O.W), LASMANIS (J), CARROLL (E.J) - Significance of leukocytes infiltration into the milk in experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis in cattle - Am.J.Vet.Res.1966, 27, 1537.1546

(48) SCHALM (O.W.), LASSMANN (J) , CARROLL (E.J) - Experimental *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in cattle -Am.J.Vet.Res. 1967, 28, 697.707

(49) SCHALM (O.W.), CARROLL (E.J), SAIN (N.C.) - Bovine mastitis - Lea & Febiger Philadelphia, 1971

(50) SCHANBACHER (F.L), SMITH (K.L) - Formation and role of unsual whey proteins and enzymes to mammary function - J.Dairy Sci. 1975, 58, 1048.1060

(51) SMITH (K.L), OLIVER (S.P) - Lactoferrin : a component of non specific defense of the involuting bovine mammary gland - In"The Ruminant immune system," edité par J.Butler - coll. Advances in experimental medicine and biology, Plenum Press, New.York 1981

(52) STAUB (A.M), RAYNAUD (M) - Cours d'immunologie de l'Institut Pasteur Fasc. II, CDU, Paris, 1971

(53) STAUB (A.M), ETIEVANT (M) - De l'alexine aux 9 constituants actuels du complément - Bull. Inst. Pasteur, Paris, 1971,69,295.317

(54) TRIGLIA (R.P), LINSCOTT (W.D) - Titers of nine complement components, conglutinin and C_3b inactivator in adult and fetal bovine sera - Molecular Immunology, 1980, 17, 741.748

(55) VARGUES (R), MORAND(B), LORTHOLARY (J) - Action des sérums de diverses espèces animales sur l'activité respiratoire de *Escherichia coli* - C.R.Séance Soc.Biol. 1962, 156, 733.737

(56) WATSON (D.L), LASCELLES (A.K) - Mechanisms of transfer of immunoglobulins in mammary secretion of ewes - Aust. J.Exp.Biol.Med.Sci. 1973, 51, 247.254

(57) WATSON (D.L), LASCELLES (A.K) - The influence of systemic immunisation during mammary involution on subsequent antibody production in mammary gland - Res.Vet.Sci. 1975, 18, 182.185

(58) WATSON (D.L) - Immunological functions of the mammary gland and its secretion - Comparative review - Aust. J.Biol. Sci. 1980, 33 , 403.422

(59) WRIGHT (S.D), LEVINE (R.D) - How complement kills *Escherichia coli*.I. Localisation of lethal lesions -J.Immunol. 1981, 127, 1146.1151

(60) YOUNGER (J.L) - Le complément chez les animaux domestiques - Thèse Doct. Vét. Toulouse , 1980.

IMP COREP
21 rue Viguerie - TOULOUSE
Tél. : (61) 42.01.56